



Universidade Nova de Lisboa

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa

Produção de Bioetanol a Partir da Microalga *Scenedesmus obliquus*

João Ricardo Pereira de Cabral Miranda

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Energia e Bioenergia

Orientadora: Doutora Paula Cristina Lima Varela Passarinho
Co-orientadora: Professora Doutora Benilde Mendes
Arguentes: Professor Doutor Nuno Carlos Lapa dos Santos Nunes
Mestre Rui Pedro Fernandes Barbosa

Fevereiro
2011

FICHA TÉCNICA

Título: Produção de bioetanol a partir da microalga *Scenedesmus obliquus*

Autor: João Ricardo Pereira de Cabral Miranda

Objectivo do presente trabalho: Dissertação apresentada à Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, para a obtenção do grau de Mestre em Energia e Bioenergia

Âmbito do estudo: Trabalho de investigação destinado à optimização de um processo de produção de bioetanol a partir da microalga *Scenedesmus obliquus*. Este trabalho envolveu produção, colheita e processamento da biomassa, e fermentação alcoólica do hidrolisado microalgal

Orientação científica do trabalho: Doutora Paula Cristina Lima Varela Passarinho (Investigadora Auxiliar do Laboratório Nacional de Energia e Geologia - LNEG)

Co-orientação científica do trabalho: Professora Doutora Benilde Mendes (Professora Associada na Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia - UNL/FCT)

Contactos do autor: joao.ricardo.miranda@gmail.com

Local: Monte da Caparica

Ano: 2011

O conteúdo da presente dissertação é da inteira responsabilidade do autor.

Não é autorizada a reprodução, total ou parcial, do conteúdo da presente dissertação, sem a autorização prévia do autor, por escrito.

É autorizada a citação do conteúdo da presente dissertação, desde que acompanhada da respectiva referência bibliográfica, de acordo com as normas internacionais e de citação de trabalhos científicos.

AGRADECIMENTOS

O estágio que realizei na Unidade de Bioenergia, do Laboratório Nacional de Energia e Geologia, I. P., foi das melhores experiências da minha vida até agora. Não obstante, foi também o objectivo mais difícil de realizar com que me deparei até agora. Várias pessoas contribuíram na realização do trabalho aqui apresentado.

Em primeiro lugar, quero agradecer à Doutora Paula Cristina Passarinho que me orientou ao longo de todo o trabalho laboratorial e escrita de tese. Este agradecimento fica aquém da gratidão que sinto por toda a disponibilidade que teve para me ensinar e ficar comigo até tarde no gabinete ou no laboratório e pelo empenho em garantir que eu aprendia como deve ser. Sentirei imensa saudade do entusiasmo com que acompanhou os nossos resultados ao longo deste ano, dos momentos de conversa e diversão e até das vezes que me “deu na cabeça” pelos disparates que cometi. Tudo o que sou num laboratório, devo-o a si.

Quero também agradecer à Doutora Luísa Gouveia, coordenadora do projecto em que estive inserido, por me ter facultado todas as condições necessárias à realização do projecto, por ter revisto a escrita da dissertação e pelo entusiasmo mostrado ao longo de todo o meu estágio.

À Graça Conceição e Natércia Sousa por toda a ajuda, apoio, preocupação, companhia, miminhos e amizade sincera. Vocês tornaram os meus dias de trabalho mais leves e agradáveis.

Aos meus pais por me terem financiado este meu projecto.

Ao Tiago Ladeira, que nunca deixou de acreditar em mim e no sucesso deste projecto, mesmo quando eu vacilei, que se sentou a meu lado e leu este texto linha por linha. A tua perseverança e fé em mim trouxeram-me até aqui.

Quero deixar um abraço ao meu melhor amigo, Hugo Machado, que reviu este documento e que se aventurou comigo nesta coisa de querer ser mestre. O mundo da economia estava a precisar de um enfermeiro!

Não posso deixar de agradecer à Dr^a Susana Marques, à Mestre Diana Francisco e à Doutora Helena Albergaria pela ajuda nas análises por HPLC e pela cedência de algumas das leveduras usadas nos ensaios de fermentação.

Por fim, agradeço a todos os amigos que fiz na Unidade de Bioenergia. Vou sentir imensa falta dos nossos almoços, das conversas *geeks* sobre os nossos projectos e das conversas arrastadas, ao sol, nas cadeirinhas do edifício F.

RESUMO

O aumento do preço dos combustíveis e as crescentes preocupações com as alterações climáticas provocadas pela emissão de gases de efeito de estufa têm impulsionado a produção de biocombustíveis. De entre as várias matérias-primas disponíveis as microalgas surgem como a uma alternativa sustentável devido à elevada produtividade e à possibilidade de cultivo em terrenos impróprios para culturas alimentares e de utilização de águas não potáveis para a produção de biomassa.

No presente trabalho estudou-se a produção de bioetanol a partir da microalga *Scenedesmus obliquus*, tendo-se optimizado métodos de ruptura celular e extracção de açúcares. Estudaram-se métodos para destoxificação do hidrolisado de microalga e seleccionaram-se leveduras para o processo fermentativo.

Dos métodos físicos e físico-químicos testados para extracção de açúcares, o que permitiu a melhor extracção foi a hidrólise de biomassa seca com ácido sulfúrico 2 N, a 120 °C durante 30 min.

Estudou-se também o efeito da iluminação no crescimento da microalga e na acumulação de açúcares. Para este estudo usou-se um fotobioreactor exterior, com ciclos de luz dia/noite, e outro interior, com iluminação artificial contínua. Neste reactor observou-se uma produtividade inferior e uma fase de morte prematura, provavelmente devido a *stress* celular. Em ambos os casos, a depleção de nitrato induziu a acumulação de açúcares por parte das células.

No final, realizou-se um ensaio global de produção de etanol desde a inoculação de uma lagoa fotossintética do tipo *raceway* de 4500 L, até à fermentação. Após 53 dias de cultivo da microalga *Scenedesmus obliquus* na lagoa obteve-se 4,7 kg de biomassa com um teor de açúcares de 30 % m.m⁻¹. O hidrolisado obtido do processamento da biomassa foi destoxificado e fermentado, por diferentes leveduras, tendo-se obtido uma concentração de etanol de 11,7 g.L⁻¹ com a melhor levedura - *Kluyveromyces marxianus*.

Palavras-chave: *Scenedesmus obliquus*, biomassa., ruptura celular, açúcares, fermentação, bioetanol,

ABSTRACT

In the last decades, two major concerns have driven the production and development of biofuels: the rising of fossil fuel prices and the climate change due to greenhouse gases. Among the available feedstocks for the production of biofuels, microalgae have been described as the most sustainable alternative, combining high productivity rates and usage of non-arable lands.

The aim of this study was to produce bioethanol from the microalgae *Scenedesmus obliquus*. The different methodologies involved were optimized, and included cellular disruption and sugar extraction, detoxification of the hydrolysate and screening of yeasts for fermentation. ,

Among the physical and physicochemical methods tested for the extraction of sugars from the biomass, the best results were obtained for an acid hydrolysis with sulfuric acid 2 N, at 120 °C for 30 min and using previously dried biomass. The influence of light on the growth of the microalgae used was studied using a photobioreactor with continuous artificial light. This resulted in a lower biomass production and in the occurrence of a premature death phase, when compared to the cultivation of the same microalgae in a photobioreactor with a day/night cycle of light. Cellular stress was the most plausible explanation of the differences between the results obtained. It was also observed, in both cases a relation between nitrate depletion and sugar accumulation in the cells.

At the end of the work, a whole study was performed from the inoculation of the microalgae in a raceway pond of 4500 L of capacity, to the fermentation. The microalgae *Scenedesmus obliquus* was cultivated for 53 days, until the sugar content reached a maximum of 30 % m.m⁻¹. The total biomass produced was 4.7 kg. The hydrolysate from the acid treatment of the biomass was detoxified and fermented by different yeasts and, the highest ethanol concentration obtained was 11.7 g.L⁻¹ with *Kluyveromyces marxianus*.

Keywords: *Scenedesmus obliquus*, biomass, cellular disruption, sugars, fermentation, bioethanol

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP – Trifosfato de adenosina

DNS – Método do reagente de ácido 3,5-dinitrossalicílico

EIA - Energy Information Administration

Eq - Equivalente

EtOH - Etanol

FS – Método do reagente fenol-sulfúrico

Glu - Glucose

HAQ – Hidrólise Ácida Quantitativa

HMF – 5-hidroximetilfurfural

HPLC – Cromatografia líquida de alta pressão

MC – meio de cultura completo

NADPH – Fosfato de dinucleótido de adenina e nicotinamida

UE – União Europeia

YMA – *Yeast Malt Agar* (mistura de extractos de levedura e malte com agar)

ÍNDICE

RESUMO	I
ABSTRACT	III
LISTA DE ABREVIATURAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIII
ÍNDICE DE QUADROS.....	XIX
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Bioetanol como Combustível Alternativo.....	3
1.2 Tipos de Biomassa Utilizados na Produção de Bioetanol.....	4
1.2.1 Biomassa Rica em Sacarose ou Amido.....	4
1.2.2 Biomassa Lenhocelulósica	5
1.3 Microalgas como Matéria-prima para Biocombustíveis Líquidos.....	9
1.3.1 Produção de Microalgas	10
1.3.1.1 Lagoas Fotossintéticas	10
1.3.1.2 Fotobiorreactores	12
1.3.2 Colheita de Biomassa Microalgal	15
1.3.3 Microalgas para Biodiesel	16
1.3.4 Microalgas para bioetanol.....	17
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
2.1 Materiais.....	21
2.1.1 Microrganismos	21

2.1.1.1	Microalga	21
2.1.1.2	Leveduras	22
2.1.2	Reagentes	22
2.1.3	Meios de crescimento	23
2.1.3.1	Microalga	23
2.1.3.2	Leveduras	23
2.2	Equipamentos	23
2.3	Métodos	26
2.3.1	Avaliação de Factores que Influenciam Metodologias Colorimétricas para a Determinação de Açúcares	26
2.3.1.1	Influência do pH da Amostra	26
2.3.1.2	Influência da Presença de Sais	26
2.3.1.3	Influência do Grau de Polimerização do Açúcar	26
2.3.2	Ruptura Celular e Extracção de Açúcares da Microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	27
2.3.2.1	Seleccção do Método de Ruptura Celular	27
2.3.2.2	Efeito da Humidade da Biomassa na Ruptura Celular	28
2.3.2.3	Optimização da Ruptura/Extracção com Ácido Sulfúrico	28
2.3.2.4	Influência da Concentração de Ácido	28
2.3.2.5	Influência da Concentração de Biomassa	29
2.3.2.6	Influência do Número de Ciclos de Extracção	29
2.3.2.7	Remoção de Sulfato de Soluções Concentradas	29
2.3.3	Seleccção de Leveduras para a Fermentação Alcoólica de Açúcares Extraídos de Microalga	29

2.3.3.1	Crescimento de Inóculos	29
2.3.3.2	Fermentação Alcoólica em Meio Sintético	30
2.3.4	Crescimento da Microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	31
2.3.5	Processo Global de Produção de Etanol a Partir da Microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	32
2.3.5.1	Produção da Biomassa	32
2.3.5.2	Extracção dos Açúcares	32
2.3.5.3	Destoxificação do Hidrolisado	33
2.3.5.4	Fermentação do Hidrolisado	33
2.3.6	Metodologias Analíticas	33
2.3.6.1	Determinação do Peso Seco de Culturas de Microalgas	33
2.3.6.2	Determinação do Teor de Humidade da Biomassa Microalgal	33
2.3.6.3	Hidrólise Ácida Quantitativa de Microalga	33
2.3.6.4	Determinação Colorimétrica do Teor em Açúcares Totais	34
2.3.6.5	Determinação Colorimétrica do Teor em Açúcares Redutores	34
2.3.6.6	Identificação e Quantificação de Açúcares por HPLC	35
2.3.6.7	Cromatografia Iónica para a Determinação de Aniões	35
2.3.6.8	Quantificação de Etanol por Cromatografia Gasosa	36
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
3.1	Optimização de Metodologias e Tecnologias de Processamento de Biomassa de <i>Scenedesmus obliquus</i> Para Produção de Bioetanol.....	37
3.1.1	Avaliação de Factores que Influenciam Metodologias Colorimétricas Para a Determinação de Açúcares.....	37
3.1.1.1	pH da Amostra	38

3.1.1.2	Presença de Sais	39
3.1.1.3	Grau de Polimerização do Açúcar	42
3.1.2	Ruptura Celular e Extracção de Açúcares da Microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	43
3.1.2.1	Seleção do Método de Ruptura Celular.....	43
3.1.2.2	Efeito da Humidade da Biomassa na Ruptura Celular	45
3.1.2.3	Optimização da Ruptura/Extracção com Ácido Sulfúrico	46
a)	Influência da Concentração de Ácido.....	47
b)	Influência da Concentração de Biomassa.....	54
c)	Influência do Número de Ciclos de Extracção de Açúcares da Biomassa	57
3.1.2.4	Remoção de Sulfato de Soluções Concentradas	58
3.1.2.5	Seleção de Leveduras para a Fermentação Alcoólica de Açúcares.....	60
a)	Crescimento de Pré-inóculos	61
b)	Fermentação Alcoólica em Meio Sintético	64
3.2	Acompanhamento do Crescimento da Microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	68
3.2.1	Fotobiorreactor Interior com Iluminação Contínua	68
3.2.2	Fotobiorreactor com Ciclo Dia/Noite	71
3.3	Processo Global de Produção de Etanol a Partir da Microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	75
3.3.1	Produção da Biomassa.....	75
3.3.2	Extracção dos Açúcares.....	79
3.3.3	Destoxificação do Hidrolisado	80
3.3.4	Fermentação do Hidrolisado.....	82

4	CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO	87
5	BIBLIOGRAFIA	91
	ANEXO I – REAGENTES QUÍMICOS	101

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO TEÓRICA	
Figura 1.1	Previsão da produção mundial de produtos petrolíferos em milhões de barris de petróleo por dia: produção de campos actuais (■), produção de campos por desenvolver (■), produção de campos por descobrir (■), gás natural liquefeito (■) e petróleo não-convencional (■) (IEA 2009). 1
Figura 1.2	Consumo de biocombustíveis na UE-27 em milhares de toneladas equivalentes de petróleo. (Eurostat 2009). 2
Figura 1.3	Molécula de sacarose - dímero de glucose e frutose. 4
Figura 1.4	Amilopectina - estrutura básica do amido. 5
Figura 1.5	Estrutura da celulose (a) e da hemicelulose (b). 6
Figura 1.6	Esquema da produção de etanol a partir de biomassa lenhocelulósica (Olsson e Hahn-Hägerdal 1996). 7
Figura 1.7	Processo conceptual para a produção de biocombustíveis a partir de biomassa microalgal (Chisti 2008). 10
Figura 1.8	Produção de microalgas numa lagoa fotossintética do tipo <i>raceway pond</i> . 11
Figura 1.9	Exemplo de diferentes tipos de fotobiorreactores: em coluna (A), <i>flat plate</i> (B) e tubulares (C). 12
CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS	
Figura 2.1	Fotobiorreactores <i>air lift</i> utilizados para manutenção das culturas de <i>Scenedesmus obliquus</i> . 22
Figura 2.2	Esquema (A) (R – fotobiorreactor, D – desgaseificador; B – bomba; P – permutador de calor) e fotografia (B) do sistema . 24

Figura 2.3	Esquema (A) e fotografia (B) do fotobiorreactor permanentemente iluminado.	24
Figura 2.4	Lagoa fotossintética de 40 m ² utilizada para produção da biomassa de <i>Scenedesmus obliquus</i> .	25
Figura 2.5	Lagoa fotossintética pequena inoculada com <i>Scenedesmus obliquus</i> .	25

CAPÍTULO 3 – APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Figura 3.1	Curvas de calibração com glucose para os métodos de avaliação do teor em açúcares totais com reagente fenol-sulfúrico (a) e açúcares redutores com reagente de ácido 3,5-dinitrossalicílico (b). Os resultados representam a média de determinações em triplicado.	38
Figura 3.2	Curvas de calibração para glucose no método do reagente de DNS: normal (●), com ácido sulfúrico 2N e uma pastilha de hidróxido de sódio (○) e com ácido, uma pastilha e 5 mL de hidróxido de sódio 10% (m.v ⁻¹) (■). Os resultados representam a média de determinações em triplicado	39
Figura 3.3	Curvas de calibração para glucose obtidas com o método do reagente de DNS para diferentes concentrações de sulfato de sódio: 0 (◆) 0,7 (●), 3 (○), 6 (■), 15 (□), 20 (▲) e 30 g.L ⁻¹ (△). Os resultados representam a média de determinações em duplicado.	40
Figura 3.4	Influência da presença de cloreto de sódio (■) no método do reagente de DNS. Os resultados representam a média de determinações em duplicado.	41
Figura 3.5	Influência da presença de sulfato de sódio (●) e cloreto de sódio (■) no método do reagente fenol-sulfúrico. Os resultados representam a média de determinações em duplicado.	41
Figura 3.6	Curvas de calibração para glucose (●) e amido (○) na determinação do teor de açúcares totais pelo método do FS. Os resultados representam a média de determinações em duplicado.	42
Figura 3.7	Ruptura celular e extracção de açúcares de biomassa húmida de <i>Scenedesmus obliquus</i> por diferentes métodos. Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.	44

Figura 3.8	Ruptura celular e extracção de açúcares de biomassa seca (■) e húmida (▣) de <i>Scenedesmus obliquus</i> por métodos físicos e por métodos físico-químicos. Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.	46
Figura 3.9	Extracção de açúcares com o tratamento de biomassa húmida (a) e seca (b) de <i>Scenedesmus obliquus</i> com diferentes concentrações de ácido sulfúrico (açúcares totais ■, açúcares redutores ▣). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes (HAQ– 8,71 % (g eq _{glu} .g bs ⁻¹)).	48
Figura 3.10	Teor em monossacáridos extraídos de biomassa húmida (a) e seca (b) de <i>Scenedesmus obliquus</i> em função da concentração de ácido sulfúrico (glucose (■); outros (▣)).	49
Figura 3.11	Teor de produtos de degradação de açúcares e de ácidos voláteis nos extractos de biomassa húmida (a) e seca (b) de <i>Scenedesmus obliquus</i> em função da concentração de ácido (ácido acético (■), ácido láctico (▣), ácido fórmico (□), ácido propiónico (▤), ácido butírico (■) e HMF (▥)). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.	50
Figura 3.12	Degradação de açúcares em condições acídicas. Adaptado de Girisuta <i>et al.</i> , (2006).	51
Figura 3.13	Extracção de açúcares com o tratamento de biomassa seca de <i>Scenedesmus obliquus</i> com diferentes concentrações de ácido sulfúrico (açúcares totais (■), açúcares redutores (▣)). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.	52
Figura 3.14	Monossacáridos extraídos da biomassa seca de <i>Scenedesmus obliquus</i> em função da concentração de ácido sulfúrico: glucose (■) e outros (▣).	53
Figura 3.15	Teor de produtos de degradação de açúcares e de ácidos voláteis nos extractos de biomassa seca de <i>Scenedesmus obliquus</i> em função da concentração de ácido (ácido acético (■), ácido láctico (▣), ácido fórmico (□), ácido propiónico (▤), ácido butírico (■) e HMF (▥)). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.	54
Figura 3.16	Extracção de açúcares de biomassa seca de <i>Scenedesmus obliquus</i> hidrolisada em ácido sulfúrico 2 N em função da concentração de biomassa. (açúcares totais: ■, açúcares redutores: ▣). Concentração de açúcares no hidrolisado (a) e extracção de açúcares por quantidade de biomassa (b). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.	55

Figura 3.17	Composição em glucose (■) e outros açúcares (▤). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.	56
Figura 3.18	Teor de produtos de degradação de açúcares em função da concentração de biomassa: ácido acético (■), ácido láctico (▤), ácido fórmico (□), ácido propiónico (▥) e HMF (■). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.	56
Figura 3.19	Extracção de açúcares com água de biomassa tratada com ácido sulfúrico 2 N (Hidrólise ácida (■), 1ª (▤), 2ª (■), 3ª (▥), 4ª (▦) e 5ª (▧) extracções). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes..	57
Figura 3.20	Remoção de sulfato por adição de 80 g.L ⁻¹ hidróxido de cálcio à temperatura ambiente (●) e a 50 °C (○) e de 90 g.L ⁻¹ à temperatura ambiente (■) e a 50 °C (□).	60
Figura 3.21	Curvas de crescimento de pré-culturas de <i>S. cerevisiae</i> (●), <i>S. bayanus</i> (■), <i>S. uvarum</i> (▲), <i>S. carlsbergensis</i> (○), <i>K. marxianus</i> (□) e <i>P. stipitis</i> (△) em 50 g.L ⁻¹ de glucose (T=30 °C; 150 rpm).	62
Figura 3.22	Relação entre a D. O. a 640 nm e o peso seco de culturas microbianas: <i>S. cerevisiae</i> (●), <i>S. bayanus</i> (■), <i>S. uvarum</i> (▲), <i>S. carlsbergensis</i> (○), <i>K. marxianus</i> (□) e <i>P. stipitis</i> (△) (50 g.L ⁻¹ de glucose, T=30 °C; 150rpm).	63
Figura 3.23	Crescimento (a), produção de etanol (b) e consumo de glucose (c) em culturas microbianas de <i>S. cerevisiae</i> (●), <i>S. bayanus</i> (■), <i>S. uvarum</i> (▲), <i>S. carlsbergensis</i> (○), <i>K. marxianus</i> (□) e <i>P. stipitis</i> (△) em meio definido com 100 g.L ⁻¹ de glucose (T=30°C; 150rpm).	65
Figura 3.24	Crescimento (a), produção de etanol (b) e consumo de açúcares (c) em culturas microbianas de <i>S. cerevisiae</i> (●), <i>S. bayanus</i> (■), <i>S. uvarum</i> (▲), <i>S. carlsbergensis</i> (○), <i>K. marxianus</i> (□) e <i>P. stipitis</i> (△) em meio definido com 64 g.L ⁻¹ de glucose e 36 g.L ⁻¹ de xilose (T=30°C; 150rpm).	66
Figura 3.25	Crescimento de <i>Scenedesmus obliquus</i> num reactor com iluminação contínua (produção de biomassa (●), consumo de nitrato (■) e variação do teor em açúcares totais da biomassa (▲)).	69
Figura 3.26	Evolução do pH de uma cultura de <i>Scenedesmus obliquus</i> no reactor com iluminação contínua.	70

Figura 3.27	Concentração de sais no meio de cultura de <i>Scenedesmus obliquus</i> crescida sob iluminação contínua: nitrato (●), fosfato (○), cloreto (■) e sulfato (□).	70
Figura 3.28	Crescimento de <i>Scenedesmus obliquus</i> num reactor exterior com ciclo dia/noite (produção de biomassa (●), consumo de nitrato (■) e variação do teor em açúcares totais da biomassa (▲)).	72
Figura 3.29	Evolução do pH da cultura de <i>Scenedesmus obliquus</i> no fotobiorreactor exterior.	71
Figura 3.30	Concentração de sais no meio de cultura de <i>Scenedesmus obliquus</i> crescida com ciclo dia/noite (nitrato (●), fosfato (○), cloreto (■) e sulfato (□)).	73
Figura 3.31	Crescimento de <i>Scenedesmus obliquus</i> numa lagoa fotossintética (produção de biomassa (●), consumo de nitrato (■) e variação do teor em açúcares totais na biomassa (▲)).	76
Figura 3.32	Evolução do pH da cultura de <i>Scenedesmus obliquus</i> numa lagoa fotossintética do tipo <i>raceway</i> .	77
Figura 3.33	Concentração de sais no meio de cultura de <i>Scenedesmus obliquus</i> cultivada numa lagoa fotossintética: nitrato (●), fosfato (○), cloreto (■) e sulfato (□).	77
Figura 3.34	Variação do teor em glucose no total de açúcares extraídos ao longo do ciclo de vida da microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> cultivada numa lagoa fotossintética. A linha a tracejado representa os 50 % de glucose.	78
Figura 3.35	Diferentes fases do cultivo e secagem de <i>Scenedesmus obliquus</i> : a) crescimento em lagoa fotossintética, b) e c) microalga centrifugada, d) biomassa antes da secagem, e) biomassa após a secagem.	79
Figura 3.36	Fases da extracção de açúcares de biomassa de <i>Scenedesmus obliquus</i> cultivada numa lagoa fotossintética: biomassa antes da adição de ácido (a), hidrolisado da biomassa antes da sua remoção (b), resíduo das hidrólises ácidas (c).	80
Figura 3.37	Crescimento (a), produção de etanol (b) e consumo de açúcares totais (c) em culturas de <i>S. bayanus</i> (▲), <i>S. carlsbergensis</i> (■) e <i>K. marxianus</i> (●) em hidrolisado de microalga (T=30°C; 150rpm).	83
Figura 3.38	Cromatograma de HPLC da análise de uma amostra de hidrolisado de <i>Scenedesmus obliquus</i> numa coluna Aminex 87P.	84

ÍNDICE DE QUADROS

	Pág
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO TEÓRICA	
Quadro 1.1	Maiores produtores mundiais de bioetanol (milhares de barris equivalentes de petróleo por dia) (EIA, 2010). 3
Quadro 1.2	Potencial de produção de bioetanol de algumas culturas. (Balata <i>et al.</i> , 2008). 8
Quadro 1.3	Principais características e desvantagens dos fotobiorreactores mais comuns (Brennan e Owende, 2010). 14
Quadro 1.4	Produtividade em biodiesel de diferentes matérias-primas (os valores para as microalgas são calculados a partir do teor em óleo) (Mata <i>et al.</i> , 2010). 16
Quadro 1.5	Teor em óleo de algumas espécies de microalgas (Chisti 2007). 17
Quadro 1.6	Produtividade em etanol de diferentes matérias-primas (os valores para as microalgas são calculados a partir do teor em açúcar) (Mussatto <i>et al.</i> , 2010). 18
Quadro 1.7	Composição bioquímica de diferentes espécies de microalgas (Spolaore <i>et al.</i> , 2006). 18
CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS	
Quadro 2.1	Composição do meio Bristol. 21
Quadro 2.2	Composição dos meios para rampas de manutenção de leveduras. 22
Quadro 2.3	Composição do meio MC de cultura para leveduras. 23

CAPÍTULO 3 – APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Quadro 3.1	Efeito da temperatura na extração de açúcares de biomassa microalgal húmida a diferentes temperaturas, durante 30 minutos.	45
Quadro 3.2	Teores em açúcares resultantes da HAQ. Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.	48
Quadro 3.3	Limites de concentração de produtos de degradação de açúcares tolerável por microrganismos.	51
Quadro 3.4	Teores em açúcares resultantes da HAQ. Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.	52
Quadro 3.5	Eficiência do número de ciclos no processo de extração de açúcares de biomassa seca de <i>Scenedesmus obliquus</i> com ácido sulfúrico 2N (Os resultados representam a média de dois ensaios independentes).	58
Quadro 3.6	Eficiência da remoção de sulfato de soluções contendo ácido sulfúrico 2N com diferentes concentrações de hidróxido de cálcio (30min de reacção).	59
Quadro 3.7	Eficiência da remoção de sulfato de soluções contendo ácido sulfúrico 2N por adição de 57 g.L ⁻¹ de hidróxido de cálcio	59
Quadro 3.8	Efeito do pH na eficiência da remoção de sulfato de soluções contendo ácido sulfúrico 2N por adição de 57 g.L ⁻¹ de hidróxido de cálcio (t=48h).	59
Quadro 3.9	Taxa específica de crescimento e tempo de duplicação para as leveduras estudadas, em pré-culturas com 50 g.L ⁻¹ de glucose (T=30 °C; 150rpm)	61
Quadro 3.10	Valores finais das fermentações em meio sintético com 100 g.L ⁻¹ de açúcar.	63
Quadro 3.11	Valores de produção a diferentes intervalos de tempo de uma fermentação com <i>S. carlsbergensis</i> em meio sintético com 100 g.L ⁻¹ de glucose e 25 g.L ⁻¹ de sulfato (30°C, 150rpm)	67
Quadro 3.12	Variação do teor iões ao longo do processo de <i>overliming</i> do hidrolisado de microalga (n.a. – não avaliado; n.d.- não detectado).	81
Quadro 3.13	Valores finais para as fermentações de hidrolisado de <i>Scenedesmus obliquus</i> (T=30°C; 150rpm).	82

Quadro 3.14 Concentração de açúcares determinada por HPLC, após fermentação, no hidrolisado de *Scenedesmus obliquus* durante as fermentações (T=30°C; 150rpm) (n.d.- não detectado). **84**

1 INTRODUÇÃO

A energia é a base de sustentação da sociedade actual. O carvão, fonte de energia que permitiu a industrialização, tem sido substituído rapidamente pelo petróleo, tendo-se tornado no produto transaccionável mais importante na economia de cada nação.

O rápido crescimento do consumo de petróleo, um recurso finito, por economias emergentes como a Índia e a China tem conduzido ao aumento do preço nos mercados e tem pressionado a sua produção. O decréscimo na produção de petróleo convencional tem posicionado a ocorrência do Pico Petrolífero entre 2009 e 2021, ponto a partir do qual a produção não conseguirá suplantar a procura, tal como vários investigadores têm alertado (de Almeida e Silva, 2009; Maggio e Cacciola, 2009). A Agência Internacional para a Energia (IEA) aponta no *World Outlook Report 2009* para um decréscimo na produção de petróleo e um aumento, ainda que ligeiro, da produção de petróleo não convencional, como o proveniente de areias betuminosas (Fig. 1.1).

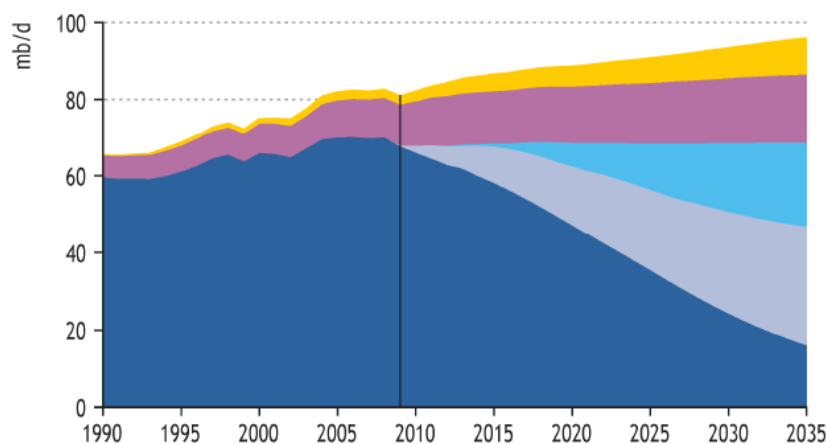


Figura 1.1 - Previsão da produção mundial de produtos petrolíferos em milhões de barris de petróleo por dia: produção de campos actuais (■), produção de campos por desenvolver (■), produção de campos por descobrir (■), gás natural liquefeito (■) e petróleo não-convencional (■) (IEA 2009).

A mudança de paradigma no consumo de combustíveis será alcançada com o desenvolvimento de combustíveis renováveis, para os quais o balanço de emissões de dióxido de carbono no processo global de produção/utilização seja neutro. A produção deste tipo de combustíveis conduzirá à diversificação das fontes de energia, permitirá enfrentar as crises de fornecimento de petróleo e aumentará a independência energética dos países (Perimenis *et al.*, 2011).

Actualmente o petróleo representa 81 % da energia total consumida em todo o mundo e 98 % da energia consumida pelo sector dos transportes (de Almeida e Silva, 2009).

Na União Europeia (UE), em 2009, o sector dos transportes representava 31,5 % do consumo de combustíveis, em que o maior consumidor era o transporte rodoviário (81,9 %). Cerca de 96,7 % dos combustíveis consumidos neste sector eram derivados de petróleo, enquanto que o consumo de biocombustíveis representava somente 1,5 %, segundo o relatório *Panorama of Transport* (Eurostat, 2009). No entanto, na União Europeia, têm sido tomadas medidas para diminuir o consumo de combustíveis fósseis, primeiro através da implementação da Directiva 2003/30/EC, que estipulou a substituição de gasolina e gasóleo em 5,75 % por biocombustíveis até Dezembro de 2010, e depois pela isenção de impostos sobre estes últimos com a Directiva 2003/96/EC.

A implementação destas medidas tem levado ao aumento do consumo de biocombustíveis no espaço comunitário (Fig. 1.2).

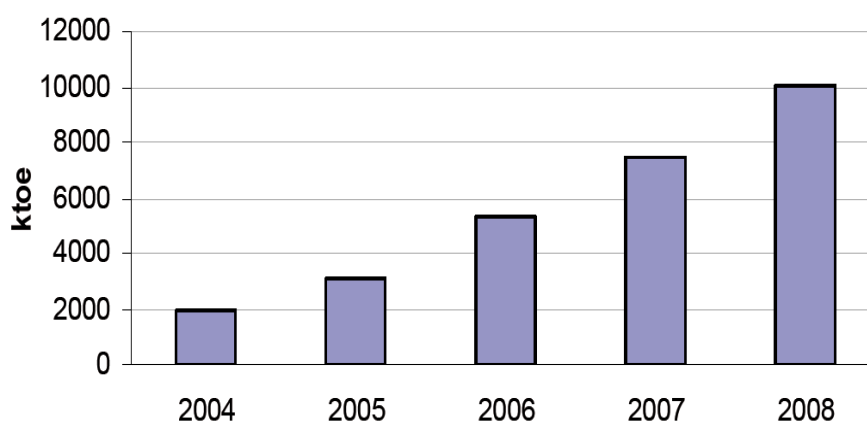


Figura 1.2 - Consumo de biocombustíveis na UE-27 em milhares de toneladas equivalentes de petróleo. (Eurostat, 2009).

Na estratégia 20 – 20 – 20, delineada em 2010, foram estabelecidos como objectivos a substituição em, pelo menos, 10 % dos combustíveis fósseis por biocombustíveis e outros combustíveis renováveis até 2020, pelo é que é de esperar que a tendência de consumo dos últimos se mantenha (Nigam e Singh, 2010).

1.1 Bioetanol como Combustível Alternativo

A produção de etanol é uma tecnologia estabelecida industrialmente. O etanol foi inicialmente utilizado como combustível no sector automóvel, tendo sido substituído pela gasolina (Chen *et al.*, 2011). Actualmente, para fazer face à depleção dos combustíveis fósseis, e para minimizar as emissões de dióxido de carbono resultantes, tem-se verificado o aumento do consumo de etanol como combustível para o sector dos transportes, quer usado a 100% (como se observa no Brasil), quer em misturas com gasolina (ex. E10, E20, E85) (Macedo *et al.*, 2008).

Enquanto combustível, o etanol apresenta características vantajosas quando comparado com a gasolina: possui um maior índice de octanas, e um calor latente de vaporização superior, o que se traduz numa maior eficiência energética do motor (Balata *et al.*, 2008).

A produção de bioetanol tem crescido rapidamente nos últimos anos (Quadro 1.1). Os dois maiores produtores, actualmente, são os Estados Unidos da América (E.U.A.) e o Brasil, segundo os dados da *Energy Information Administration* (EIA, 2010), a partir do milho e da cana-de-açúcar, respectivamente.

Quadro 1.1 – Maiores produtores mundiais de bioetanol (milhares de barris equivalentes de petróleo por dia) (EIA, 2010).

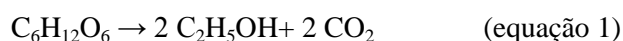
País	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
E.U.A.	106	115	140	183	221	255	319	425	606	713
Brasil	184	198	217	249	252	276	306	389	466	450
China	0	0	5	13,8	17,2	20,7	24,1	28,7	34,3	37
França	2	2	2	1,7	1,7	2,5	5	9,3	17	21,5
Canadá	3,7	3,9	4	4	4	4,4	4,4	13,8	16,3	18,7
Alemanha	0	0	0	0	0,4	2,8	7,4	6,8	10	13
Tailândia	0	0	0	0	0,1	1,2	2,2	3	5,7	6,9
Índia	2,9	3	3,2	3,3	3,5	3,7	4,1	4,5	4,6	5,8

Embora a produção de bioetanol tenha aumentado na EU-27 de 1803 milhões de litros em 2007, para 2855 milhões de litros em 2008, a quantidade de biodiesel produzida continua a ser 3 vezes superior (8813 milhões de litros) (Sorda *et al.*, 2010) devido ao facto de o mercado europeu ser excendentário em gasolina.

1.2 Tipos de Biomassa Utilizados na Produção de Bioetanol

O etanol pode ser produzido a partir de diferentes tipos de biomassa, como as ricas em açúcar ou amido, que requerem poucos pré-tratamentos, e a biomassa lenhocelulósica que, devido à sua elevada complexidade, requer pré-tratamentos fortes (Ogbonna *et al.*, 2001)

Após os pré-tratamentos, quando necessários, a glucose extraída é convertida a etanol por microrganismos, normalmente leveduras (equação 1).



1.2.1 Biomassa Rica em Sacarose ou Amido

A glucose é formada nas plantas pela captura da energia solar e fixação de dióxido de carbono durante a fotossíntese e é posteriormente armazenada sob a forma de açúcares mais ou menos complexos.

A beterraba sacarina, o sorgo sacarino e a cana-de-açúcar são exemplos de biomassa em que a glucose é armazenada na forma de sacarose (Wu *et al.*, 2010; Razmovski e Vučurović, 2011; Ogbonna *et al.*, 2001). A sacarose (Fig. 1.3) é facilmente hidrolisada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* aos seus dois monómeros constituintes, glucose e frutose (Sánchez e Cardona, 2008), o que evita a necessidade de aplicação de pré-tratamentos, podendo estes açúcares ser fermentados de seguida pelo microrganismo.

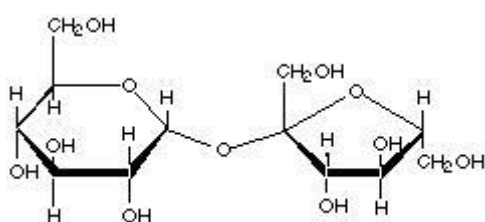


Figura 1.3 - Molécula de sacarose - dímero de glucose e frutose.

Outra das formas possíveis de armazenamento de glucose nas plantas é sob a forma de amido. O amido consiste é formado por dois polímeros: a amilose e a amilopectina. A amilose consiste numa cadeia linear de resíduos de glucose ligados por ligações α -1,4-glicosídicas e a amilopectina é um polímero ramificado em que pode ocorrer a formação de ligações

α -1,6-glicosídicas (Fig. 1.4). Estes dois polímeros são encontrados no amido em proporções variáveis, e juntos formam uma matriz estável e resistente à degradação.

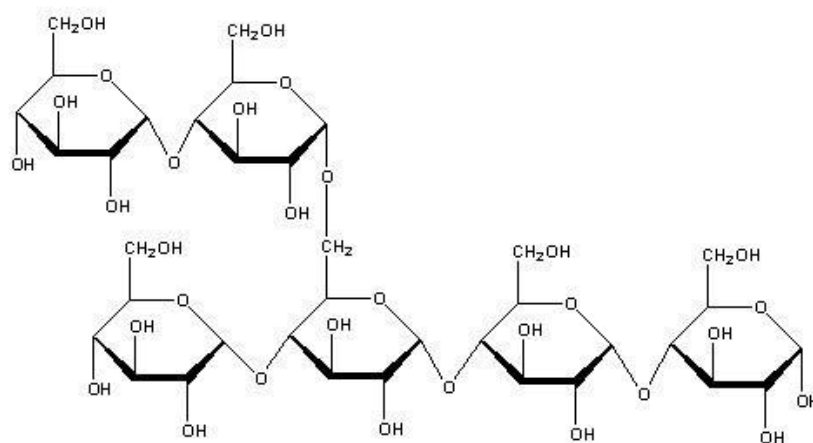


Figura 1.4 - Amilopectina - estrutura básica do amido.

Entre os vários tipos de biomassa rica em amido encontram-se o milho, o trigo e a batata. Contudo, como as leveduras não são capazes de hidrolisar este polissacárido, é sempre necessário um pré-tratamento para hidrólise do amido, como as hidrólises enzimática ou ácida (Tasic *et al.*, 2009; Tester *et al.*, 2006).

A produção de bioetanol a partir de culturas sacarinas e amiláceas designa-se por etanol de 1^a geração, pois é um processo simples já implementado industrialmente. No entanto, este não é o processo mais sustentável de produção de combustíveis, pois provoca pressão sobre o preço dos alimentos, já que muitas destas matérias-primas também podem ser utilizadas para alimentação humana e animal, causa a degradação acelerada dos solos e consome grandes quantidades de água. Além disso, a produção de etanol de 1^a geração está sujeita à sazonalidade das culturas.

1.2.2 Biomassa Lenhocelulósica

A biomassa lenhocelulósica corresponde a mais de 50 % da biomassa produzida mundialmente (Claassen *et al.*, 1999), constituindo-se como uma importante matéria-prima para a produção de bioetanol. A designação biomassa lenhocelulósica inclui: madeiras e ervas (Sørensen *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2008), resíduos das indústrias agro-pecuária (Neureiter *et al.*, 2002; Toro *et al.*, 2010) e da madeira (Xavier *et al.*, 2010) e resíduos sólidos municipais (inclui resíduos alimentares vegetais, relva e papel usado (Li *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2010)).

A biomassa lenhocelulósica é composta por celulose, hemicelulose e lenhina, em proporções que variam consideravelmente com a natureza da biomassa (Ledigabel e Averous, 2006). A celulose (Fig. 1.5), o polímero mais abundante na natureza, é formada por resíduos de glucose unidos por uma ligação β -1,4-glucosídica. A natureza desta ligação faz com que as unidades de glucose fiquem alinhadas num ângulo de 180° , formando uma cadeia plana, o que permite um elevado grau de empacotamento das fibras. A hemicelulose é um polímero cuja composição é mais complexa que a da celulose, e em que o monossacárido predominante é a xilose, uma pentose, embora a glucose também esteja presente na sua composição (Buranov e Mazza, 2010).

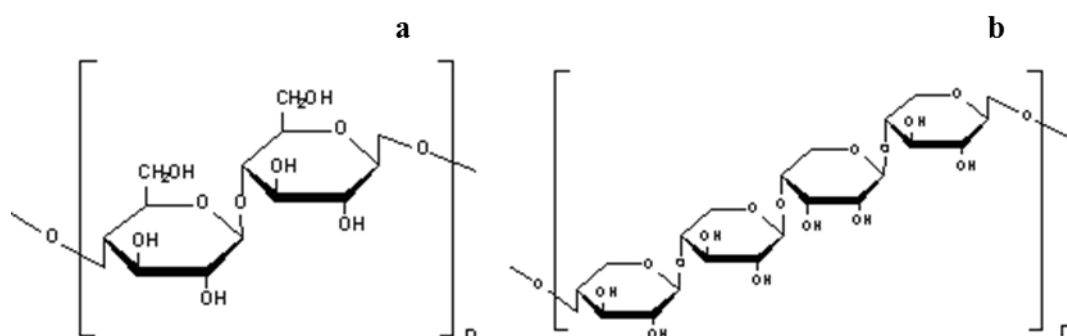


Figura 1.5 - Estrutura da celulose (a) e da hemicelulose (b).

A lenhina é o segundo polímero mais abundante na natureza, correspondendo a cerca de 30 % de todo o carbono orgânico. A sua estrutura é muito complexa, sendo uma associação de várias moléculas, entre as quais se encontram os álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico (Boerjan *et al.*, 2003). A presença de lenhina dificulta o acesso à celulose e dá origem à formação de compostos recalcitrantes, pelo que a biomassa lenhocelulósica tem que ser sujeita a pré-tratamentos fortes para a sua remoção (Hubbell e Ragauskas, 2010).

Pela sua complexidade, a biomassa lenhocelulósica tem que ser tratada, para extracção dos açúcares, antes de poder ser fermentada (Fig. 1.6) (Olsson e Hahn-Hägerdal, 1996). O pré-tratamento tem como objectivo destruir a matriz formada pelas fibras de celulose, hemicelulose e lenhina. Durante esta primeira fase, a estrutura cristalina da celulose é destruída, a hemicelulose solubilizada e a lenhina libertada e/ou degradada.

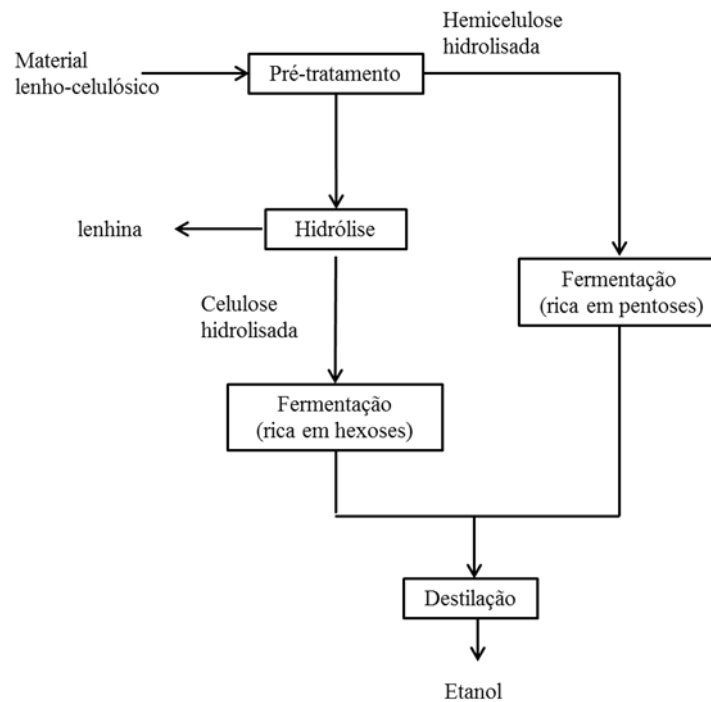


Figura 1.6 - Esquema da produção de etanol a partir de biomassa lenhocelulósica (Olsson e Hahn-Hägerdal, 1996).

Existem vários tipos de pré-tratamentos para biomassa lenhocelulósica sendo os mais comuns a explosão com vapor, a hidrólise ácida e o tratamento alcalino.

No tratamento por explosão com vapor, a biomassa é exposta a vapor a pressões elevadas (0,69 a 4,85 MPa (Sánchez e Cardona, 2008)), e em seguida a uma brusca redução da pressão, o que provoca a quebra da estrutura lenhocelulósica, hidrólise das fibras de hemicelulose e despolimerização da lenhina. Este procedimento permite o tratamento de vários tipos de biomassa, como palhas e madeiras, com extracção de grandes quantidades de açúcares (Hongzhang e Liying, 2007; Negro *et al.*, 2003). Num estudo realizado com resíduos de oliveira conseguiram extrair 54,6 % m.m⁻¹ de açúcares, à temperatura de 200 °C com um tempo de residência de 5 min (Cara *et al.*, 2008), enquanto que com carolo de milho foi conseguida uma extracção de 25 % m.m⁻¹ a 180 °C, durante o mesmo tempo (Zimbardi *et al.*, 2007).

O tratamento de biomassa com ácido sulfúrico é o método mais comum no tratamento de biomassas lenhocelulósicas. Este processo permite usar uma temperatura de reacção menor (entre os 120 e 140 °C) (Guo *et al.*, 2008; Sun e Tao, 2010), com uma recuperação de açúcares derivados da hemicelulose mais elevada do que a explosão com vapor (Sánchez e Cardona, 2008).

A adição de soluções alcalinas diluídas à biomassa provoca a expansão das fibras, destruindo a sua estrutura cristalina e reduzindo a sua polimerização. A lenhina é degradada e as ligações entre polímeros são destruídas. Este método é considerado demasiado caro para ser usado em grande escala (Lynd *et al.*, 2002).

Os açúcares poliméricos obtidos no pré-tratamento da biomassa lenhocelulósica poderão seguidamente ser sujeitos a hidrólise enzimática para se tornarem fermentescíveis. No entanto, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que é a levedura mais importante nos processos de fermentação alcoólica, não consegue degradar pentoses, como a xilose, pelo que é necessário recorrer a outros tipos de microrganismos quando se pretende produzir etanol de origem lenhocelulósica (Alvira *et al.*, 2010).

Ao etanol produzido a partir de biomassa lenhocelulósica dá-se o nome de etanol de 2ª geração, dada a maior complexidade do processo de produção e porque, em geral, não utiliza matérias-primas destinadas à alimentação humana e animal (Soccol *et al.*, 2010).

No entanto, como se pode observar no Quadro 1.2, as culturas com maior potencial para a produção de etanol são o arroz, milho e o trigo, que são exactamente as culturas que constituem a base da alimentação humana.

Quadro 1.2 - Potencial de produção de bioetanol de algumas culturas. (Balata *et al.*, 2008).

Cultura	Potencial de produção de etanol (L.t⁻¹)
Cana-de-açúcar	70
Beterraba	110
Batata-doce	125
Batata	110
Milho	360
Arroz	430
Centeio	250
Trigo	340
Sorgo sacarino	60
Biomassa celulósica	280

1.3 Microalgas como Matéria-prima para Biocombustíveis Líquidos

As microalgas são pequenos organismos fotossintéticos que se encontram em água salgada ou doce. Embora o mecanismo fotossintético seja semelhante ao das plantas superiores, a ausência de estruturas como o caule e folhas, e o facto de se encontrarem submersas em água facilita o acesso ao dióxido de carbono e a nutrientes, conferindo uma maior eficiência na conversão da energia solar em biomassa (Schenk *et al.*, 2008).

As microalgas surgem, no actual panorama energético, como a única matéria-prima sustentável capaz de assegurar a produção de biocombustíveis segundo Chisti (2007). A produção de biocombustíveis a partir de microalgas terá um menor impacto ambiental, não competindo por espaço com as culturas alimentares ao contrário dos biocombustíveis produzidos a partir de outras matérias-primas.

As microalgas possuem várias características que lhe permitem tornar-se a matéria-prima preferencial para a produção de biocombustíveis em relação a outras culturas:

- Maior eficiência fotossintética do que as plantas terrestres (3-8% nas microalgas vs 0,5 % nas plantas superiores), o que se repercute em maiores produtividades por área de terreno.
- Maior capacidade de remoção de dióxido de carbono.
- Manuseamento mais fácil, por serem cultivadas em meio líquido.
- Versatilidade em relação à utilização de água, podendo crescer em água doce e salgada, mas também em efluentes e águas residuais (Godos *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010; Kong *et al.*, 2010), o que permite reduzir custos no fornecimento de nutrientes e/ou despoluir cursos de água.
- Possibilidade de cultivo em terrenos impróprios para crescimento de culturas alimentares.
- Produção não sazonal, podendo haver várias colheitas ao longo de todo o ano.
- Possibilidade de estimulação para acumulação de óleos e/ou glícidos.

Num conceito de biorefinaria, a possibilidade de valorização dos resíduos da biomassa microalgal, por extracção de compostos de alto valor acrescentado (proteínas e pigmentos), permitirão reduzir os custos da produção industrial de microalgas. Os efluentes resultantes da colheita poderão ser reaproveitados para novas culturas de microalgas (Fig. 1.7) (Chisti, 2008).

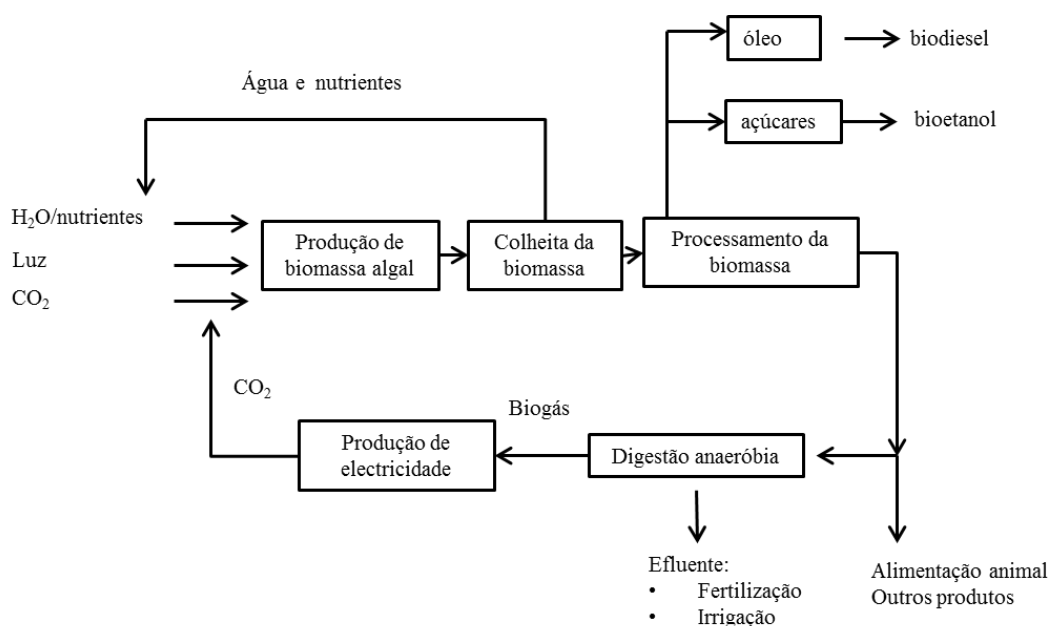


Figura 1.7 – Processo conceptual para a produção de biocombustíveis a partir de biomassa microalgal (Chisti, 2008).

1.3.1 Produção de Microalgas

A produção de microalgas é um processo muito versátil, quer em relação à fonte de energia utilizada quer em relação ao método de produção.

Embora a maior parte das microalgas cresça fotoautotroficamente, pela conversão da energia solar a energia química através da fotossíntese, com consumo de carbono inorgânico, (nomeadamente dióxido de carbono) várias espécies apresentam também metabolismo heterotrófico e mixotrófico. No metabolismo heterotrófico, a fonte de energia é exclusivamente carbono orgânico, geralmente sob a forma de glucose e/ou acetato (Wen e Chen, 2003, Perez-Garcia *et al.*, 2010) não havendo a necessidade de energia luminosa. Algumas espécies de microalgas apresentam um metabolismo mixotrófico e conseguem simultaneamente realizar a fotossíntese e consumir carbono inorgânico e orgânico, o que permite aumentar a sua produtividade (Bhatnagar *et al.*, 2011)

A produção de microalgas heterotróficas é realizada em fermentadores, enquanto que a produção de microalgas autotróficas e mixotróficas é realizada em sistemas iluminados como os fotobiorreactores e as lagoas fotossintéticas.

1.3.1.1 Lagoas Fotossintéticas

As lagoas fotossintéticas são fotobiorreactores abertos, pouco profundos (10 - 50 cm) para permitir a difusão de dióxido de carbono proveniente da atmosfera e a penetração da luz solar,

construídos em cimento ou terra compactada impermeabilizada por plástico (Chisti 2007). O sistema mais comum é o do tipo *raceway pond*, em que a agitação da cultura é realizada por agitação mecânica de pás (Fig. 1.8), sendo utilizado para a produção industrial de microalgas das espécies de *Spirulina*, *Chlorella*, *Arthrospira platensis*, *Anabaena sp.*, *Nannochloropsis* e *Dunaliella* (Reijnders, 2009; Jorquera *et al.*, 2010; Chisti, 2007).



Figura 1.8 - Produção de microalgas numa lagoa fotossintética do tipo *raceway pond*.

Este sistema apresenta vantagens relacionadas com o baixo custo de construção, a quantidade reduzida de energia necessária para operação e com a facilidade de manutenção da temperatura, por estar em contacto directo com a atmosfera promovendo uma elevada dissipação de calor (Mata *et al.*, 2010). Por outro lado, a inexistência de isolamento entre o meio de cultura e a atmosfera conduz a elevadas perdas de água por evaporação e torna o sistema mais vulnerável à contaminação por outros microrganismos. O sistema de pás utilizado para mistura da cultura não consegue, em geral, gerar turbulência suficiente para garantir a difusão óptima de dióxido de carbono para o meio e a homogeneização da cultura. Por esta razão há sempre uma grande parte da população celular que não consegue captar luz e fonte de carbono suficientes, o que se traduz em baixas produtividades (Jiménez *et al.*, 2003).

Com o objectivo de aumentar a produtividade nas lagoas fotossintéticas têm sido propostas algumas soluções como a sua cobertura, criando uma estufa, e a injeção de ar e dióxido de

carbono proveniente de gases de exaustão, garantindo assim uma mistura mais eficiente da cultura e maior fornecimento de dióxido de carbono (Hase *et al.*, 2000; Zeiler *et al.*, 1995; Ketheesan e Nirmalakhandan, 2011).

1.3.1.2 Fotobiorreactores

A produção de microalgas em sistemas fechados permite ultrapassar as maiores dificuldades do cultivo em sistemas abertos, reduzindo os riscos de contaminação por outros microrganismos, aumentando a eficiência na utilização de luz, e permitindo o controlo das condições da cultura, com maior produtividade de biomassa (Borowitzka, 1999; Brennan e Owende, 2010). Ao contrário dos sistemas abertos, os fotobiorreactores fechados têm como principal desvantagem um elevado custo de construção e operação.

Existem vários tipos de fotobiorreactores, sendo que os mais comuns são os tubulares, em coluna e os do tipo *flat-plate*, (Fig. 1.9).



Figura 1.9 - Exemplo de diferentes tipos de fotobiorreactores: em coluna (A), *flat plate* (B) e tubulares (C).

Os sistemas *flat-plate* consistem em paralelepípedos de vidro, plástico ou outro material que permita a passagem da radiação solar, em que o ar é injectado pela base, fornecendo o dióxido de carbono necessário ao crescimento da biomassa e criando turbulência para que todas as

células tenham acesso à radiação solar. A eficiente turbulência, o reduzido percurso óptico e a reduzida acumulação de oxigénio na cultura, o reduzido gasto de energia auxiliar e a fácil remoção de algas sedimentadas, permitem não só produtividades elevadas de biomassa como também são muito atractivos do ponto de vista industrial. O aproveitamento da radiação incidente pode ainda ser maximizado pela orientação dos reactores em função da deslocação do Sol (Harun *et al.*, 2010a; Cheng-Wu *et al.*, 2001).

O princípio subjacente aos fotobiorreactores em coluna não difere do dos fotobiorreactores *flat-plate*, uma vez que o arejamento e mistura da coluna são realizados pela injeção de ar. Contudo, o formato cilíndrico do reactor permite que este tenha sempre apenas metade da sua superfície iluminada. Embora as produtividades sejam elevadas, a possibilidade de *scale up* para instalações industriais é limitada devido à altura do reactor e ao percurso óptico da cultura (Grima *et al.*, 1999).

Os fotobiorreactores tubulares são normalmente de vidro ou plástico e surgem num conjunto de tubos transparentes com diâmetro inferior a 0,1 m. Estes tubos não podem ser de grande diâmetro uma vez que é necessária luz para que o processo de fotossíntese ocorra. Porém, este tipo de sistema está sujeito à acumulação de concentrações elevadas de oxigénio, ao sobreaquecimento da cultura e à formação de gradientes de pH (Chisti, 2007; Grima *et al.*, 1999) e por isso, acoplado aos tubos, encontra-se habitualmente um desgaseificador, que tem como propósito não só a remoção do oxigénio mas também o arrefecimento da cultura. A estrutura tubular aumenta a área iluminada repercutindo-se em produtividades elevadas.

Embora os fotobiorreactores fechados permitam produzir maiores quantidades de biomassa, a quantidade de energia que requerem para agitação e difusão do dióxido de carbono torna-os pouco apelativos para a produção de microalgas para biocombustíveis, usando-se essencialmente para a produção de compostos de elevado valor acrescentado. Numa análise de ciclo de vida realizada por Jorquera *et al* (2010), foi estudada a produção de óleo pela microalga *Nannochloropsis* cultivada em lagoas fotossintéticas e em fotobiorreactores tubulares e *flat-plate*. A produção em fotobiorreactores tubulares foi considerada economicamente inviável, em detrimento dos outros dois processos de cultivo. Dos três, o método mais favorável foi o cultivo em lagoa fotossintética.

No Quadro 1.3 encontram-se resumidas as vantagens e desvantagens dos principais sistemas de produção de microalgas (Brennan e Owende, 2010).

Quadro 1.3 - Principais vantagens e desvantagens dos fotobiorreactores mais comuns (Brennan e Owende, 2010).

Sistema de produção	Vantagens	Limitações
<i>Raceway pond</i>	Relativamente barato Fácil de limpar Uso de terreno não agrícola Requer pouca energia Fácil manutenção	Baixa produtividade de biomassa Requer grandes áreas Limitado a algumas espécies de algas Reduzida homogeneidade Contaminação fácil das culturas
Fotobiorreactor tubular	Grande superfície de iluminação Viável para culturas no exterior Construção relativamente barata Boa produtividade de biomassa	Crescimento de algas nas paredes do reactor Requer grandes áreas Formação de gradientes de pH, oxigénio dissolvido e CO ₂ ao longo dos tubos
Fotobiorreactor <i>flat-plate</i>	Altas produtividades de biomassa Fácil de esterilizar Reduzida acumulação de oxigénio Controlo fácil das condições de crescimento Boas condições de iluminação Grande superfície iluminada Viável para culturas no exterior	<i>Scale up</i> difícil Difícil de controlar a temperatura Baixo nível de <i>stress</i> hidrodinâmico Baixo nível de crescimento de algas nas paredes do reactor
Fotobiorreactor em coluna	Compacto Elevada transferência de massa Baixos níveis de consumo de energia Turbulência elevada Reduzido <i>stress</i> mecânico Fácil de esterilizar Baixos níveis de foto-inibição e foto-oxidação	Reduzida área de iluminação Construção sofisticada e cara

1.3.2 Colheita de Biomassa Microalgal

As microalgas crescem em culturas muito diluídas, o que implica que tenham que ser processadas grandes quantidades de líquido para a sua colheita e com elevado gasto energético. Por esta razão, a colheita da biomassa microalgal tem sido referido como sendo o passo-chave para a produção industrial de biocombustíveis a partir de microalgas (Lee *et al.*, 2010a; Zhang *et al.*, 2010).

Entre os métodos tradicionalmente utilizados para colheita de microalgas encontram-se a sedimentação gravimétrica, a centrifugação, a floculação, a filtração e a flotação.

A sedimentação, ou gravitação, consiste na concentração da biomassa pelo simples assentamento das células. Este processo é lento e o produto final contém um elevado teor de água.

A recuperação de biomassa por centrifugação é rápida, mas requer o consumo de muita energia, o que tem como consequência o aumento dos custos. Por isso, este tipo de método de colheita só costuma ser utilizado após a biomassa ter sido previamente concentrada.

Um dos métodos que tem ganho muito interesse é a concentração por coagulação/floculação, uma vez que permite recuperar biomassa com menores custos económicos relativamente à centrifugação. Este processo consiste na adição de produtos químicos capazes de induzir a agregação de células de microalga quer por neutralização ou inversão das cargas eléctricas das paredes celulares (coagulação), quer pela formação de ligações entre as microalgas (de Godos *et al.*, 2010). Entre os compostos capazes de induzir a coagulação de microrganismos encontram-se o cálcio (na forma de carbonato, óxido ou hidróxido), o sulfato de alumínio, o cloreto de ferro (III), o sulfato de ferro (III), e o cloreto de polialumínio. Os flocculantes orgânicos usados incluem os polielectrólitos catiónicos e/ou aniónicos e polímeros como os derivados de amido, alginato, quitosano, entre outros (Renault *et al.*, 2009)

A filtração de culturas de microalgas permite remover a totalidade de microalgas do meio de cultura, passando-o por membranas de poros reduzidos (Babel *et al.*, 2002). Embora já existam instalações de aquacultura em que o processamento do meio de cultura é realizado por filtração (Rossignol *et al.*, 1999), este método apresenta algumas limitações já que as membranas podem ficar rapidamente colmatadas, o que reduz a capacidade de filtração.

1.3.3 Microalgas para Biodiesel

O potencial da produção de óleos por microalgas tem sido descrito como sendo substancialmente superior ao observado com as culturas de oleaginosas convencionais, embora a produtividade em biomassa e teor em óleo varie com a espécie de microalga utilizada e com as condições e meio de cultivo (Mata *et al.*, 2010) (Quadro 1.4).

Quadro 1.4 – Produtividade em biodiesel de diferentes matérias-primas (os valores para as microalgas são calculados a partir do teor em óleo) (Mata *et al.*, 2010).

Matéria-prima	Teor de óleo (% m.m ⁻¹)	Produtividade em óleo (L.ha ⁻¹ a ⁻¹)	Área necessária (m ² .ano ⁻¹ .kg ⁻¹ biodiesel)	Produtividade em biodiesel (kg.ha ⁻¹ .a ⁻¹)
Milho	44	172	66	152
Soja	18	636	18	562
<i>Jatropha</i>	28	741	15	656
<i>Camelina</i>	42	915	12	809
Girassol	40	1 070	11	946
Palma	36	5 366	2	4 747
Microalga (Teor reduzido de óleo)	30	58 700	0,2	51 927
Microalga (Teor médio de óleo)	50	97 800	0,1	86 515
Microalga (Teor elevado de óleo)	70	136 900	0,1	121 104

Com se pode ver no Quadro 1.4, mesmo uma microalga com reduzido teor de óleo permitirá produzir uma quantidade de biodiesel, cerca de 10 vezes superior à palma, cultura rica em óleo, e amplamente explorada para a produção de biodiesel (Pleanjai e Gheewala, 2009). Esta característica permitirá não só reduzir o impacte ambiental associado ao biodiesel mas também colmatar mais rapidamente as necessidades energéticas, substituindo o petróleo.

Várias estirpes de microalgas têm sido já estudadas e seleccionadas de acordo com a sua produtividade e capacidade de acumulação de lípidos. No Quadro 1.5 encontram-se algumas espécies de microalgas com elevados teores de óleo (Chisti, 2007).

Quadro 1.5 – Teor em óleo de algumas espécies de microalgas (Chisti, 2007).

Microalga	Teor em óleo (% m.m ⁻¹)
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella</i> sp.	28-32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16-37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis</i> sp.	25-33
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris</i> sp.	20-35
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia</i> sp	45-47
<i>Phaedactylum tricornutum</i>	20-30
<i>Schizochytrium</i> sp.	50-77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23

O óleo contido nas microalgas, depois de extraído, pode ser convertido a biodiesel por transesterificação, tecnologia já industrialmente implementada no processamento de óleos vegetais (Janaun e Ellis, 2010).

1.3.4 Microalgas para bioetanol

À semelhança do que se sucede com o potencial das microalgas para a produção de biodiesel, as elevadas produtividades destes microrganismos e a capacidade de algumas espécies acumularem elevados teores de açúcares, torna este tipo de biomassa também muito apelativo para servir como matéria-prima para a produção de bioetanol (Quadro 1.6) (Mussatto *et al.*, 2010).

Matsumoto *et al.*, (2003), por exemplo, procederam à selecção de várias espécies de microalgas marinhas ricas em açúcares tendo identificado um total de 76 espécies de microalgas como contendo teores em açúcares entre 40 e 53 % m.m⁻¹.

Quadro 1.6 – Produtividade em etanol de diferentes matérias-primas (os valores para as microalgas são calculados a partir do teor em açúcar) (Mussatto *et al.*, 2010).

Matéria-prima	Produtividade em etanol (L.ha ⁻¹)
Trigo	2 590
Mandioca	3 310
Sorgo sacarino	3 050 – 4 070
Milho	3460 – 4 020
Beterraba sacarina	5 010 – 6 680
Cana-de-açúcar	6 190 – 7 500
Microalgas	46 760 – 140 290

Sendo esta uma área da investigação em microalgas ainda embrionária, e, embora já tenham sido identificadas algumas espécies com teores elevados de açúcares (Quadro 1.7) (Spolaore *et al.*, 2006), ainda é necessário proceder à selecção de novas espécies capazes de acumular naturalmente teores elevados de açúcares, identificar processos de indução de açúcares e determinar os melhores métodos para sacarificar a biomassa.

Quadro 1.7 - Composição bioquímica de diferentes espécies de microalgas (Spolaore *et al.*, 2006).

Espécie	Açúcares (% m.m ⁻¹)
<i>Anabaena cylindrica</i>	25 – 30
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	12 – 17
<i>Dunaliella salina</i>	32
<i>Porphyridium cruentum</i>	40 – 57
<i>Scenedesmus obliquus</i>	10 – 17
<i>Spirulina máxima</i>	13 – 16
<i>Synechococcus sp.</i>	15
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	26
<i>Spirogira sp</i>	33 – 64

As algas também têm capacidade de fermentação directa produzindo etanol em condições de anaerobiose através do consumo dos açúcares armazenados intracelularmente. Já foi descrita a produção de etanol com rendimento de 1% (m.m⁻¹) para a microalga *Chlamydomonas reinhardtii* (Hirano *et al.*, 1997) e 2,07% (m.m⁻¹) para a *Chlorococum littorale* (Ueno *et al.*,

1998). Também já foi observada este tipo de metabolism na microalga *Chlamydomonas perigranulata* (Hon-nami e Kunito, 1998; Hon-Nami, 2006).

Este processo, designado por fermentação no escuro, implica gastos reduzidos de energia, pois não requer o processamento da biomassa, mas até agora os resultados publicados não foram muito promissores.

Contudo, a fermentação alcoólica por meio de leveduras, que é um processo estabelecido industrialmente, ainda não foi muito explorada em extractos microalgais, provavelmente porque os açúcares contidos na biomassa microalgal têm que ser extraídos para posterior fermentação. Embora haja várias opções de tratamento da biomassa, como a extracção supercrítica (Harun *et al.*, 2009), que permite uma elevada eficiência na extracção de açúcares, as hipóteses de tratamento mais promissoras em termos económicos serão métodos análogos aos já implementados para matérias-primas convencionais.

O tratamento alcalino de biomassa de *Chlorococum infusionum* mostrou ser eficiente na extracção de açúcares permitindo uma produtividade em etanol de $0,26 \text{ g}_{\text{EtOH}} \cdot \text{g}^{-1} \text{ bs}^{-1}$ (Harun *et al.*, 2010b). Também o tratamento de biomassa com ácido sulfúrico diluído foi explorado com biomassa de *Chlorococum humicola* e *Chlamydomonas reinhardtii* tendo-se obtido concentrações máximas de etanol de 7,2 e 14,6 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente (Harun e Danquah, 2011b; Nguyen *et al.*, 2009).

Uma das abordagens a ter em consideração no processamento de biomassa de microalgas para a produção de bioetanol poderá passar pelo tratamento bioquímico, utilizando enzimas como a α -amilase e a amiloglucosidase, tal como realizado com a microalga *Chlamydomonas reinhardtii* para a qual se conseguiu uma produtividade em etanol de $0,24 \text{ g}_{\text{EtOH}} \cdot \text{g}^{-1}$ (Choi *et al.*, 2010). Num estudo realizado por Harun e Danquah (2011b), a utilização de celulasas excretadas pelo fungo *Trichoderma reesei* permitiu obter uma extracção máxima de açúcares de 64,2 % $\text{m} \cdot \text{m}^{-1}$ da biomassa de *Chlorococum sp.*

Para além disso, em espécies de microalgas capazes de produzirem açúcares, a sua acumulação pode ser estimulada pela indução de estados de *stress* metabólico. O estado de *stress* geralmente resulta da carência de nutrientes essenciais como nitrato, fosfato e/ou sulfato, mas também pode ser devido à adição de compostos tóxicos. Douskova *et al* (2009) conseguiram induzir uma acumulação de amido de 83, 50 e 33 % na microalga *Chlorella vulgaris*, pela privação de fosfato, nitrato e sulfato, respectivamente. Também estudaram o efeito da inibição da proteossíntese, que se repercutiu na duplicação da quantidade de amido na biomassa.

A adição de ferro (III) a culturas de microalgas permite também aumentar o teor em açúcares em microalgas oceânicas devido ao aumento da eficiência da fotossíntese. Porém esta acumulação depende da quantidade luz incidente e é consequência de um efeito sinérgico entre

a suplementação e a iluminação da cultura (Oijen *et al.*, 2005). Factores como o aumento da temperatura ou a salinidade também já foram documentados como tendo efeito estimulador na acumulação de açúcares por microalgas (Warr *et al.*, 1985).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

2.1.1 Microrganismos

2.1.1.1 Microalga

Para o estudo da obtenção de açúcares foi utilizada uma microalga da espécie *Scenedesmus obliquus*, adquirida à Algoteca da Universidade de Coimbra, Portugal.

A alga foi mantida em meio de cultura Bristol cuja composição se encontra no Quadro 2.1 em reactores *air lift* de vidro com capacidade de 1 L. (Fig. 2.1).

Quadro 2.1 – Composição do meio Bristol.

Nutriente	Concentração
Nitrato de sódio	250 mg.L ⁻¹
Hidrogenofosfato de potássio	75 mg.L ⁻¹
Cloreto de cálcio dihidratado	33 mg.L ⁻¹
Sulfato de magnésio heptahidratado	75 mg.L ⁻¹
Dihidrogenofosfato de potássio	175 mg.L ⁻¹
Cloreto de sódio	25 mg.L ⁻¹
Sal de ferro do ácido etilenodiaminatetracético	60 mg.L ⁻¹
Ácido bórico	2,86 mg.L ⁻¹
Sulfato de manganésio tetrahidratado	2,03 mg.L ⁻¹
Sulfato de zinco heptahidratado	220 µg.L ⁻¹
Sulfato de cobre	50 µg.L ⁻¹
Molibdato de sódio	60 µg.L ⁻¹
Sulfato de cobalto heptahidratado	90 µg.L ⁻¹



Figura 2.1 - Fotobiorreactores *air lift* utilizados para manutenção das culturas de *Scenedesmus obliquus*.

2.1.1.2 Leveduras

Os ensaios de fermentação foram realizados com leveduras das estirpes *Saccharomyces cerevisiae* DER 24, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae I-uvarum* CCMI 885, *Saccharomyces carlbergensis* ATCC-6269, *Kluyveromyces marxianus* YPCC 2671 e *Pichia stipitis* CBS 181.F.

As leveduras foram conservadas em rampas com meio de repicagem MR, à excepção da levedura *Pichia stipitis* CBS 181.F para a qual foi utilizado meio de repicagem YMA (Quadro 2.2).

Quadro 2.2 – Composição dos meios para rampas de manutenção de leveduras.

Nutrientes	MR (g.L ⁻¹)	YMA (g.L ⁻¹)
Glucose	20	11
Agar	20	20
Peptona	10	5
Extracto de levedura	5	3
Extracto de malte	-	3

2.1.2 Reagentes

Os reagentes utilizados ao longo do trabalho encontram-se descritos no Quadro I.1, do Anexo I.

2.1.3 Meios de crescimento

2.1.3.1 Microalga

Para a produção de microalga *Scenedesmus obliquus*, foi usado meio de cultura Bristol com valor de pH de 7 (Quadro 2.1).

2.1.3.2 Leveduras

Para os ensaios de fermentação as leveduras foram inoculadas em meio de cultura (MC) com um valor de pH de 4,5, e com a composição base que se encontra no Quadro 2.3, à qual se adicionou glucose ou misturas de glucose e xilose como fonte de carbono.

Quadro 2.3 – Composição do meio MC de cultura para leveduras.

Nutriente	Concentração (g.L ⁻¹)
Sulfato de amónio	5
Dihidrogenofosfato de potássio	5
Sulfato de magnésio heptahidratado	1
Extracto de levedura	5

Antes de ser usado, o meio foi esterilizado em autoclave (HL-36AC da Newclave) a 120°C durante 15 min.

2.2 Equipamentos

As microalgas utilizadas na selecção e optimização do método de ruptura celular e extracção de açúcares da biomassa foram cultivadas num fotobiorreactor de coluna de bolhas em PVC com capacidade de 50 L e arejamento por sistema *venturi*, sendo a cultura recirculada por uma bomba GRUNDFOS CH2-50 AA-CUBE, através de um *chiller* para controlo de temperatura (Fig. 2.2).

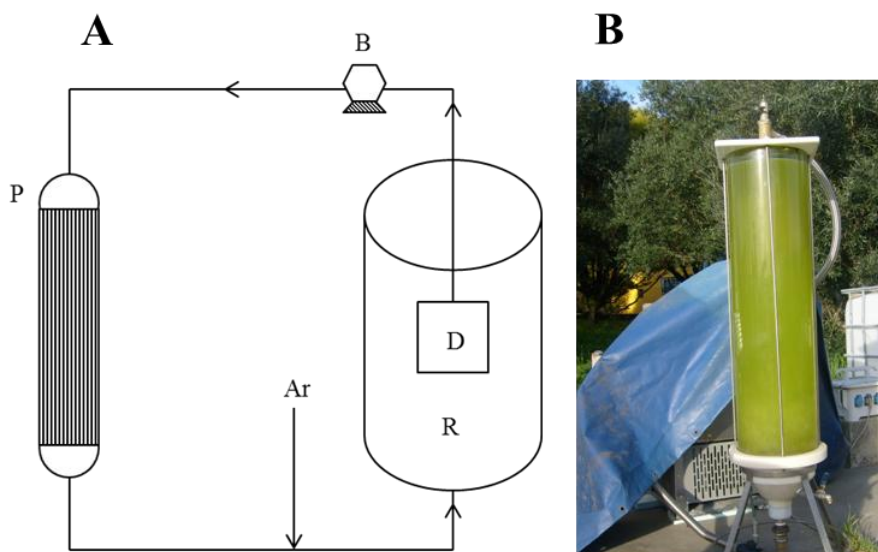


Figura 2.2 - Esquema (A) (R – fotobiorreator, D – degaseificador; B – bomba; P – permutador de calor) e fotografia (B) do sistema .

Para estudar o efeito da iluminação no crescimento das microalgas foi utilizado também um fotobiorreator de PVC com 10 L de capacidade, permanentemente iluminado com luz artificial (lâmpadas fluorescentes Philips TL-D 36 W/54-765). A agitação e arejamento da cultura foram realizados por meio de um sistema *air-lift* com ar comprimido (Fig. 2.3).

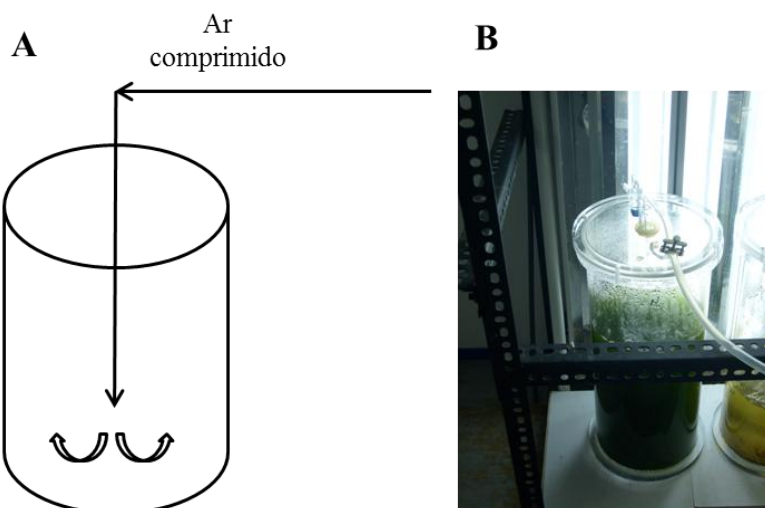


Figura 2.3 - Esquema (A) e fotografia (B) do fotobiorreator permanentemente iluminado.

A biomassa microalgal necessária para a produção de bioetanol foi produzida numa lagoa fotossintética do tipo *raceway* com volume inicial de 4500 L e área útil de 40 m² construída em cimento revestido por lona. Foi utilizado um motor OLIMAR V5CPDF2 associado a um sistema de pás para agitar a cultura a uma velocidade aproximada de 5 m.min⁻¹ (Fig. 2.4).



Figura 2.4 - Lagoa fotossintética de 45 m² utilizada para produção da biomassa de *Scenedesmus obliquus*.

A preparação do inóculo para a lagoa grande envolveu a utilização de três lagoas fotossintéticas, em fibra de vidro, semelhantes à de 4500 L mas com um volume final de 300 L cada. Nestas a mistura da cultura é realizada por pás mecânicas, a uma velocidade de 7 m.min⁻¹ (Fig. 2.5).



Figura 2.5 – Lagoa fotossintética pequena inoculada com *Scenedesmus obliquus*.

Antes de cada inoculação os reactores foram descontaminados com lixívia durante dois dias e os ensaios foram realizados em modo descontínuo.

2.3 Métodos

2.3.1 Avaliação de Factores que Influenciam Metodologias Colorimétricas para a Determinação de Açúcares

2.3.1.1 pH da Amostra

O reagente do método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) para determinação de concentrações em açúcares redutores é fortemente alcalino, pelo que o pH das amostras a analisar, em caso de estas serem fortemente ácidas, poderá reduzir a sua eficiência.

Por esta razão foram realizados estudos para avaliar da necessidade de neutralizar/alcalinizar amostras ácidas, construindo rectas de calibração para soluções de glucose com concentrações crescentes entre 0,1 e 1,5 g.L⁻¹. As soluções de glucose foram preparadas em ácido sulfúrico com concentração 2 N.

No primeiro ensaio, foi adicionada a cada solução ácida uma pastilha de hidróxido de sódio (~ 97 mg) antes de iniciar a análise com adição do reagente de DNS e completar o protocolo como descrito na secção 2.3.6.5. No segundo, às soluções ácidas neutralizadas com uma pastilha de hidróxido de sódio foi adicionado o reagente de DNS e seguido o restante protocolo substituindo a adição final de 5 mL de água destilada pela adição de 5 mL de solução concentrada de hidróxido de sódio (100 g.L⁻¹).

2.3.1.2 Presença de Sais

Foi estudada a interferência, nos métodos colorimétricos, da neutralização de amostras contendo ácido sulfúrico ou clorídrico com hidróxido de sódio. Para tal, foram analisadas soluções de glucose com concentrações de 0,3 g.L⁻¹, para o método de determinação de açúcares redutores, e de 0,06 g.L⁻¹, para o método de determinação de açúcares totais (secção 2.3.6.4) e com diferentes concentrações de sulfato de sódio e de cloreto de sódio entre 0 e 100 g.L⁻¹.

Construíram-se também rectas de calibração, para a determinação do teor em açúcares redutores (secção 2.3.6.5), com concentrações de glucose entre 0,1 e 1,5 g.L⁻¹ e de sulfato de sódio entre 0,7 e 30 g.L⁻¹.

2.3.1.3 Grau de Polimerização do Açúcar

O método do reagente de fenol-sulfúrico (FS) para determinação do teor em açúcares totais permite a hidrólise de açúcares poliméricos. Dado que alguns autores indicam a produção de

amido (polímero de glucose) por certas microalgas (Kim *et al.*, 2007) avaliou-se a eficiência do método FS na análise deste polissacárido.

A partir de uma solução mãe de amido 1 g.L⁻¹, solubilizado por fervura, foram preparadas soluções com concentrações entre os 5 e os 100 mg.L⁻¹ a partir das quais foi construída uma recta de calibração do método para determinação de açúcares totais (secção 2.3.6.4).

2.3.2 Ruptura Celular e Extracção de Açúcares da Microalga *Scenedesmus obliquus*

Para selecção e optimização do método de ruptura celular e extracção de açúcares da microalga *Scenedesmus obliquus*, as culturas de microalga foram crescidas no fotobiorreactor de coluna de bolhas (Fig. 2.1) e posteriormente concentradas por centrifugação a 18 592 g, durante 15 min a 4 °C, numa centrífuga Avanti J25 da Beckman.

Os ensaios de ruptura foram realizados em duplicado, com cerca de 2,5 g de biomassa concentrada (biomassa húmida). As amostras ácidas foram filtradas em filtros de 13 mm de diâmetro e porosidade 0,45 µm (Acrodisc GHP; Pall Life Sciences) e as restantes amostras em filtros de acetato de celulose de igual diâmetro e porosidade (Sartorius GmbH). Após filtração, foi avaliado no extracto o teor em açúcares totais (secção 2.3.6.4) e em açúcares redutores (secção 2.3.6.5) e, em certos casos, foram também identificados os açúcares presentes por cromatografia líquida de alta pressão HPLC (secção 2.3.6.6).

Cada lote de microalga usado foi ainda caracterizado quanto ao teor em açúcares recorrendo a hidrólise ácida quantitativa (secção 2.3.6.3) seguida de análise pelo método do reagente FS (secção 2.3.6.4).

2.3.2.1 Selecção do Método de Ruptura Celular

Foram experimentadas diferentes abordagens para ruptura celular e extracção de açúcares da biomassa microalgal: tratamentos físicos (sonicação, abrasão por esferas de vidro, homogeneização e temperatura) e associação de tratamentos químicos e físicos (ataque ácido e alcalino sob pressão e temperatura).

Nos ensaios de sonicação a amostra de biomassa foi colocada num tubo de ensaio largo de plástico ao qual se adicionou 5 mL de água destilada. A amostra foi submetida a sonicação, num aparelho Labsonic L. B. Braun equipado com uma sonda 1000 L B. Braun a 200 W, durante 30 s. Foi colocada de seguida em gelo durante 10 min. Este procedimento foi realizado cinco vezes seguidas para cada amostra.

No tratamento da biomassa com esferas de vidro, a cada amostra de biomassa foram adicionados 10 mL de água destilada e, aproximadamente, 900 mg de esferas de vidro (Sigma, 425 a 600 μm) em tubo de ensaio. As amostras foram desintegradas em agitador de vórtice durante 1 min e colocadas em gelo durante igual período de tempo. Este procedimento foi realizado cinco vezes seguidas para cada amostra.

Nos ensaios de homogeneização, cada amostra foi suspensa em 5 mL de água destilada num tubo de homogeneização. A biomassa foi sujeita à acção de um homogeneizador Heidolph DIAX 24000 rpm durante 2,5 min. Este processo foi repetido após um período de repouso de 10 min em gelo.

No processamento físico-químico da biomassa, foram adicionados 5 mL de solução 3 N de ácido clorídrico (HCl), ácido sulfúrico (H_2SO_4) ou hidróxido de sódio (NaOH), às amostras. Após agitação forte, os tubos de ensaio, tapados com rolhas de algodão e papel de alumínio, foram colocados no autoclave previamente aquecido a 100 °C. Considerou-se como tempo inicial do ensaio, o momento em que a temperatura atingiu 120 °C e a pressão de 1,2 bar. O ensaio decorreu durante 30 min, contudo as amostras só foram retiradas do autoclave quando a temperatura desceu abaixo de 100 °C (aproximadamente 90 min após o início do ensaio).

Para estudar o efeito da temperatura na ruptura celular, foram também realizados ensaios apenas com água destilada, nas condições descritas no parágrafo anterior, assim como foram também realizados 2 ensaios com 5 mL de ácido sulfúrico a duas temperaturas alternativas: em banho a 58 °C e a 82 °C e pressão normal.

2.3.2.2 Efeito da Humidade da Biomassa na Ruptura Celular

Para avaliar o efeito da humidade da biomassa, foram realizados ensaios semelhantes aos ensaios descritos na secção 2.3.3, utilizando 0,5 g de biomassa obtida por secagem de cerca de 2,5 g de biomassa húmida, a 80 °C, durante 24h, seguida de moagem manual em almofariz.

2.3.2.3 Optimização da Ruptura/Extracção com Ácido Sulfúrico

2.3.2.4 Influência da Concentração de Ácido

Para definir qual a concentração de ácido sulfúrico mais adequada, foram realizados ensaios, em duplicado, de ruptura/extracção com biomassa seca e húmida (quantidade de biomassa equivalente a 0,5 g de biomassa seca) e 5 mL de ácido sulfúrico com concentrações na gama de 0,05 a 10 N. A hidrólise decorreu como descrito na secção 2.3.2.1.

2.3.2.5 Influência da Concentração de Biomassa

Mantendo o volume de 5 mL de ácido sulfúrico 2N e nas condições de hidrólise descritas previamente (secção 2.3.2.1), foram realizados ensaios, em duplicado, com diferentes quantidades de biomassa seca (secção 2.3.2.2) entre 0,1 e 2,5 g.

2.3.2.6 Influência do Número de Ciclos de Extração

Os resíduos resultantes dos ensaios da secção 2.6.3.2 foram concentrados por centrifugação (centrífuga HERAEUS Multifuge 38 R+ da Thermo Scientific) a 11 820 g, durante 10 min, à temperatura ambiente.

Os açúcares remanescentes nos resíduos sólidos foram extraídos com 5 mL de água destilada a 50 °C durante 2 min, sob agitação em agitador de vórtice. A suspensão foi novamente centrifugada e o sobrenadante foi removido para análise. Este procedimento foi realizado cinco vezes para cada amostra.

2.3.2.7 Remoção de Sulfato de Soluções Concentradas

A remoção de sulfatos de soluções concentradas foi realizada segundo a técnica de *overliming*. Esta, consiste na adição de hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), com formação de sais insolúveis de sulfato de cálcio. Fizeram-se alguns testes para avaliar a eficiência do processo. Assim, em *erlenmeyers* com solução de H_2SO_4 2N foram adicionadas diferentes quantidades de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (57 - 90 g.L^{-1}) à temperatura ambiente. Foi também realizado um ensaio a 50°C para avaliar o efeito da temperatura na precipitação e outros a diferentes níveis de pH ácido, quantificados num aparelho InoLab Level 1 da WTW.

Durante os ensaios manteve-se uma agitação contínua em placa magnética e foram retiradas amostras ao longo do tempo, para determinação do teor em sulfatos por cromatografia iónica (secção 2.3.6.7) após filtração por filtros de acetato de celulose com 13 mm de diâmetro e porosidade 0,45 μm (Sartorius GmbH).

2.3.3 Selecção de Leveduras para a Fermentação Alcoólica de Açúcares Extraídos de Microalga

2.3.3.1 Crescimento de Inóculos

Para inocular os meios de cultura para os ensaios de fermentação, é necessário usar uma cultura em boas condições de desenvolvimento. Para tal, realizaram-se ensaios para caracterização do

crescimento de leveduras das estirpes *Saccharomyces cerevisiae* DER 24, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae I-uvarum* CCMII 885, *Saccharomyces carlbergensis* ATCC-6269, *Kluyveromyces marxianus* YPCC 2671 e *Pichia stipitis* CBS 181.F.

Estes ensaios de crescimento foram realizados em *erlenmeyers* de 500 mL contendo 250 mL de meio MC com 50 g.L⁻¹ de glucose (secção 2.1.6), inoculados por ançada a partir de um crescimento em rampa. Os *erlenmeyers*, tapados com rolhas de algodão, foram mantidos numa incubadora orbital New Brunswick Scientific, a 30 °C e a 150 rpm até se atingir a fase estacionária do crescimento das leveduras.

Ao longo do crescimento foram retiradas amostras para avaliar o crescimento celular por leitura espectrofotométrica a 640 nm, num espectrofotómetro Hitachi U-2000, com diluição adequada,

A interferência da cor do meio de cultura na determinação da densidade óptica foi eliminada, subtraindo ao valor da densidade óptica da amostra diluída, o valor da densidade óptica da amostra com a mesma diluição depois de centrifugada numa centrífuga de bancada (modelo 315 da Büchi) a 21 500 g durante 7 min.

Na fase final do crescimento foi feita a determinação da relação entre o valor de densidade óptica a 640 nm e o peso seco de cada uma das culturas de levedura. Para tal, as células foram recolhidas e concentradas por centrifugação a 11 820 g durante 7 min. As células foram então lavadas com água destilada, centrifugadas novamente e ressuspensas em água destilada de modo a obter uma suspensão celular com um valor de densidade óptica de 5 (considerando 0,5 numa diluição 1:10). A partir da suspensão celular concentrada prepararam-se, em balões de 100 mL, várias suspensões, por diluição com água (1:10, 1:20, 1:30, 1:40 e 1:60), cuja densidade óptica foi determinada também a 640 nm.

Foi ainda filtrado um volume de 5 mL de suspensão celular, em triplicado, por filtros de fibra de vidro de 47mm de diâmetro e poro de 0,45 µm (GF/C da Whatman), previamente lavados com água destilada, secos a 80 °C durante 24 h e tarados. Os filtros com levedura foram posteriormente secos a 80 °C até peso constante.

2.3.3.2 Fermentação Alcoólica em Meio Sintético

Para seleccionar as leveduras para a produção de etanol realizaram-se ensaios de fermentação em meio sintético MC com 100 g.L⁻¹ de glucose e com misturas de glucose e xilose (64 g.L⁻¹: 36 g.L⁻¹).

Para inocular os ensaios utilizaram-se leveduras em crescimento exponencial provenientes de pré-culturas similares às descritas na secção 2.3.3.1 e recolhidas por centrifugação durante 7 min a 11 180 g. As células foram lavadas duas vezes com água destilada esterilizada e, no final,

foram ressuspensas em água destilada esterilizada com volume necessário para obter uma concentração final de biomassa de 10 g.L^{-1} . O concentrado celular (2,5 mL) foi então adicionado ao meio de fermentação (250 mL) em *erlenmeyers* de 500 mL tapados com rolhas de borracha furadas com uma agulha (concentração inicial de biomassa = 100 mg.L^{-1}). Todos os ensaios foram realizados a 30°C e a 150 rpm numa incubadora orbital.

Ao longo dos ensaios, foram retiradas amostras para caracterização em termos de concentração celular por leitura espectrofotométrica a 640 nm e, após centrifugação a $11\,820 \text{ g}$, durante 10 min em centrífuga de bancada, o sobrenadante foi reservado para determinação de açúcares pelo método do reagente (FS) (secção 2.3.6.4) e por HPLC (secção 2.3.6.6) e para determinação de etanol por cromatografia gasosa (secção 2.3.6.8).

Foi ainda realizado um ensaio similar apenas com *Saccharomyces carlsbergensis* em meio sintético MC com 100 g.L^{-1} de glucose ao qual se adicionou 20 g.L^{-1} de sulfato na forma de sulfato de sódio, perfazendo um total de 25 g.L^{-1} de sulfato, para estudar a sua capacidade fermentativa em condições adversas.

2.3.4 Crescimento da Microalga *Scenedesmus obliquus*

Para o estudo do crescimento da microalga em diferentes condições de iluminação, foram realizados dois ensaios, usando os fotobioreactores de PVC descritos na secção 2.2. Um dos ensaios decorreu no exterior, com ciclo dia-noite, usando o fotobiorreator de coluna de bolhas com 50 L. O outro ensaio decorreu no laboratório e foi realizado no fotobiorreator de PVC com 10 L de capacidade permanentemente iluminado com luz artificial.

Os dois reactores foram inoculados a partir da mesma pré-cultura, e em simultâneo. Em cada amostragem foi retirado 1,5 L de meio e, após leitura espectrofotométrica a 540nm e filtração de um volume de 50 mL, em duplicado, para determinação do peso seco da cultura (secção 2.3.6.1), o volume restante foi centrifugado a $18\,592 \text{ g}$ e 4°C durante 15 min para concentrar a biomassa. Parte do sobrenadante obtido foi reservado para leitura de pH e determinação do teor de sais (secção 2.3.6.7), tendo o restante sido repostado no fotobiorreator respectivo. A biomassa foi seca para avaliar o teor de humidade (secção 2.3.6.2).

Aproximadamente 0,5 g de biomassa seca foi hidrolisada, na presença de 5 mL de H_2SO_4 2N a 120°C , durante 30 min em autoclave. Após filtração por filtros de 13 mm de diâmetro e porosidade $0,45 \mu\text{m}$ (Acrodisc GHP; Pall Life Sciences), o hidrolisado foi analisado para determinação do teor em açúcares totais (secção 2.3.6.4).

2.3.5 Processo Global de Produção de Etanol a Partir da Microalga *Scenedesmus obliquus*.

2.3.5.1 Produção da Biomassa

A biomassa microalgal necessária para a produção de bioetanol foi cultivada na lagoa fotossintética do tipo *raceway pond* com volume inicial de 4500 L (secção 2.2) entre os dias 28 de Setembro e 22 de Novembro de 2010.

A inoculação desta lagoa de grande tamanho requereu a preparação de vários inóculos em volumes sucessivamente maiores. Primeiro, foi inoculado o fotobiorreactor em coluna de bolhas descrito na secção 2.2. Três semanas após a inoculação deste ($DO = 2$), a cultura foi transferida equitativamente para três lagoas fotossintéticas pequenas (Fig. 2.5) e, quando o valor de densidade óptica das culturas nas lagoas pequenas atingiu o valor de 0,6, foram transferidas para a lagoa fotossintética de 45 m².

Nesta cultura a colheita de amostras foi realizada sempre no mesmo ponto da lagoa e o processamento foi semelhante ao descrito para os ensaios em fotobiorreactor (secção 2.3.4). Sempre que foi realizada uma toma de amostra, foi também medida a altura do líquido na lagoa para avaliar potenciais efeitos da pluviosidade ou evaporação. O ensaio decorreu até se observar estabilização do teor em açúcares.

No final do ensaio, a agitação foi desligada e durante dois dias a biomassa foi deixada a sedimentar. Procedeu-se então à decantação da cultura até um volume final de 900 L. A cultura concentrada foi, então, transferida para reservatórios onde ficou novamente a sedimentar e só depois se procedeu à sua centrifugação a 18 592 g, durante 15 min a 4 °C, numa centrífuga Avanti J25 da Beckman. A biomassa centrifugada foi seca em tabuleiros a 80 °C até peso constante.

2.3.5.2 Extracção dos Açúcares

Para extrair os açúcares da biomassa microalgal seca, esta foi primeiro reduzida a fragmentos de dimensões mais reduzidas com um maço. Porções de 1500 g de biomassa seca foram colocadas em *erlenmeyers* de 5 L de capacidade, aos quais foram adicionados 3 L de ácido sulfúrico 2N. De cada vez, a mistura foi devidamente agitada e o *erlenmeyer* fechado com uma rolha de algodão tapada com folha de alumínio. A hidrólise foi realizada em autoclave durante 30 min a 120 °C. Este procedimento foi realizado até terem sido processados 4500 g de biomassa e, no final, separou-se o sobrenadante de cada hidrólise com a ajuda de um passador de plástico. Os sobrenadantes provenientes das várias hidrólises foram misturados.

2.3.5.3 Destoxificação do Hidrolisado

Para reduzir a concentração de sulfato, foram adicionadas ao hidrolisado, à temperatura ambiente, quantidades sucessivas de Ca(OH)_2 sob agitação, em placa magnética, durante cerca de 3 dias, procedendo-se à monitorização, ao longo do tempo, do nível de remoção em amostras filtradas (filtros acetato de celulose de 13 mm de diâmetro e porosidade 0,45 μm ; Sartorius GmbH), e analisadas por cromatografia iónica (secção 2.3.6.7).

No final, o hidrolisado foi centrifugado a 18 592 g durante 15 min e o valor de pH ajustado a 5,4 pela adição de ácidos orto-fosfórico e nítrico.

2.3.5.4 Fermentação do Hidrolisado

Os ensaios de fermentação com as leveduras *K. marxianus*, *S. carlbergensis* e *S. bayanus*, foram realizados com 500 mL de hidrolisado, num *erlenmeyer* de 1L, inoculados com 300 mg.L^{-1} de pré-culturas em fase de crescimento exponencial com glucose. O procedimento foi similar ao descrito na secção 2.3.3.2.

2.3.6 Metodologias Analíticas

2.3.6.1 Determinação do Peso Seco de Culturas de Microalgas

A determinação do peso seco das culturas de microalgas foi realizada filtrando um volume conhecido de cultura, homogeneizada num agitador de vórtice, por filtros de fibra de vidro de 47mm de diâmetro e poro de 0,45 μm (GF/C da Whatman) previamente lavados com água destilada, secos a 80 °C durante 24 h e tarados.

Após a filtração, os filtros foram novamente secos a 80 °C até peso constante.

2.3.6.2 Determinação do Teor de Humidade da Biomassa Microalgal

Para determinar o teor de humidade na biomassa microalgal foi colocada uma pequena porção (aproximadamente 2 g) de biomassa, concentrada por centrifugação a 18 592 g durante 15 min a 4 °C numa caixa de Petri, previamente seca a 80 °C durante 24 h e tarada. O conjunto foi seco a 80 °C em estufa até se registar peso constante.

2.3.6.3 Hidrólise Ácida Quantitativa de Microalga

A hidrólise ácida quantitativa permite determinar a concentração total de açúcares, garantindo a hidrólise total da biomassa (Hoebler *et al.*, 1989). Num tubo de ensaio largo, com 0,5 g de biomassa seca (ou quantidade equivalente de biomassa húmida), foram adicionados 5 mL de

ácido sulfúrico 72% (m.m^{-1}). Foi seguidamente colocado num banho termostatzado a 30 °C durante 1 h. O conteúdo do tubo foi então transferido para um frasco rolhado de 250 mL e foram adicionados 139 mL de água destilada, diluindo o ácido sulfúrico para uma concentração final de 4% (m.m^{-1}). O frasco, devidamente fechado, foi colocado no autoclave durante 1 h à temperatura de 120 °C. Este procedimento foi realizado, em duplicado, para cada lote de microalga colhido em alturas diferentes.

2.3.6.4 Determinação Colorimétrica do Teor em Açúcares Totais

O teor em açúcares totais foi determinado pelo método do reagente fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956).

Inicialmente foi preparada uma solução de fenol 5 % (m.v^{-1}), dissolvendo 50 g de fenol e diluindo a 1 L, que se conservou em frasco escuro.

A 1 mL de amostra, devidamente diluída, foi adicionado igual volume da solução de fenol e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi, posteriormente, homogeneizada em agitador de vórtice. A reacção ocorreu durante 10 min, tendo o tubo de ensaio sido, no fim, colocado num banho de água fria durante 15 min. A densidade óptica de cada mistura foi lida num espectrofotómetro a 490 nm contra um ensaio branco em que a amostra foi substituída por água destilada.

Foi construída uma recta de calibração com concentrações entre 10 e 100 mg.L^{-1} de glucose.

2.3.6.5 Determinação Colorimétrica do Teor em Açúcares Redutores

O teor em açúcares redutores foi determinado pelo método do reagente de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) (Miller 1959).

A preparação do reagente necessário passou por dissolver em água destilada 10 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico, 16 g de hidróxido de sódio e 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio, diluindo a 1 L. A solução foi, por fim, filtrada e conservada num frasco escuro.

A 500 μL de amostra, devidamente diluída, foi adicionado igual volume de reagente de DNS num tubo de ensaio. A mistura foi homogeneizada em agitador de vórtice e incubada durante 5 min num banho a 100 °C. Deixou-se repousar durante 10 min até atingir a temperatura ambiente e adicionou-se 5 mL de água destilada. A densidade óptica de cada mistura foi lida espectrofotometricamente a 540 nm contra um ensaio branco em que a amostra foi substituída por água destilada.

A concentração em açúcares redutores da amostra foi obtida a partir de uma recta de calibração

com concentrações de glucose entre 0,05 e 1,5 g.L⁻¹.

2.3.6.6 Identificação e Quantificação de Açúcares por HPLC

A identificação e quantificação de açúcares nos hidrolisados de alga foram realizadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) HPLC (Merck Hitachi, Darmstadt, Alemanha) equipado com uma bomba (L-7100), um forno (L-73-50), um detector de índice de refração (La Chrom L-7490) e um injetor automático (Merck, L-72000), com um volume de injeção fixo de 20 µL. A identificação e quantificação de produtos da degradação de açúcares foi realizada no mesmo sistema usando um detector de UV-Vis (LaChrom L-7490).

Foram usadas 2 colunas diferentes: Aminex HPX-87H e Aminex HPX-87P (Bio-Rad Laboratories). A análise com a coluna HPX-87H foi realizada à temperatura constante de 50 °C e 45 °C, para a coluna e detector respectivamente. As amostras foram eluídas com solução de ácido sulfúrico 5 mM, filtrada (filtros com poro 0,2 µm e diâmetro de 47 mm de polietersulfona hidrofílica (Supoc 200; Pall Life Sciences)) e desgaseificada a um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹.

No caso da HPX-87P a análise foi realizada à temperatura constante de 85 °C e 45 °C para a coluna e detector, respectivamente. As amostras foram eluídas com água *Millipore* filtrada (filtros com poro 0,2 µm e diâmetro de 47 mm de polietersulfona hidrofílica (Supoc 200; Pall Life Sciences)) e desgaseificada, a um fluxo de 0,6 mL.min⁻¹.

Em ambos os casos, foram preparadas soluções de calibração para cada um dos compostos a analisar, usadas como padrões externos, na gama de 2 a 15 g.L⁻¹.

2.3.6.7 Cromatografia Iónica para a Determinação de Aniões

A determinação de cloreto, nitrato, nitrito, fosfato e sulfato foi realizada num cromatógrafo Dionex ICS – 1000, equipado com supressor ASRS – ULTRA II, pré-coluna AG14 A 4 x 50 mm, coluna IONPAC AS14 A, 4 x 250 mm e detector de condutividade, e com um volume de injeção fixo de 25 µL. O eluente usado consistiu numa solução de carbonato de sódio 8 mM com bicarbonato de sódio 1 mM, previamente filtrada por filtros de polipropileno hidrofílico de 47 mm de diâmetro e 0,2 µm de poro (Pall Sciences) e desgaseificada por ultra-sons (P-Selecta ULTRASON-S-H) durante 15 min. A análise das amostras realizou-se com um fluxo de eluente de 1 mL.min⁻¹.

Foram preparadas soluções de calibração para cada um dos compostos a analisar, usadas como padrões externos, na gama de 0,5 e 30 mg.L⁻¹.

2.3.6.8 Quantificação de Etanol por Cromatografia Gasosa

A determinação de etanol foi realizada num cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 5890 equipado com injector *on-column*, coluna de enchimento (4 % Carbowax 20M, 1 % ácido trimesílico, 80 – 120 Carbopack BDA), de 2 m de comprimento e 1/8' de diâmetro interno e detector de ionização de chama (FID). As temperaturas do injector, coluna e detector foram configuradas para 150 °C, 110 °C e 200 °C, respectivamente. Foi utilizado hélio como gás de arrastamento.

De cada vez, foi injectado 1 µL de amostra e a concentração de etanol foi determinada usando 2-propanol como padrão interno.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As microalgas pertencentes ao género *Scenedesmus* encontram-se onde exista água doce sendo frequentemente as microalgas dominantes (Kim *et al.*, 2007). A microalga *Scenedesmus obliquus* foi uma das primeiras algas a serem cultivadas *in vitro* devido ao seu rápido crescimento (Celekli *et al.*, 2008), utilização de diferentes fontes de azoto como nitrato, nitrito e amónia (Urrutia *et al.*, 1995) e capacidade de sobrevivência numa gama larga de temperaturas (15 a 40 °C) (Martínez *et al.*, 1999). Por estas razões, esta microalga tem sido utilizada para produção de biomassa, tratamento de águas em lagoas de oxidação (Hodaifa *et al.*, 2009, Lavoie e Noüe, 1985) e já foi estudada a possibilidade da sua utilização no tratamento de efluentes de lagares (Hodaifa *et al.*, 2009; Hodaifa *et al.*, 2010) e de águas residuais urbanas (Martínez *et al.*, 2000).

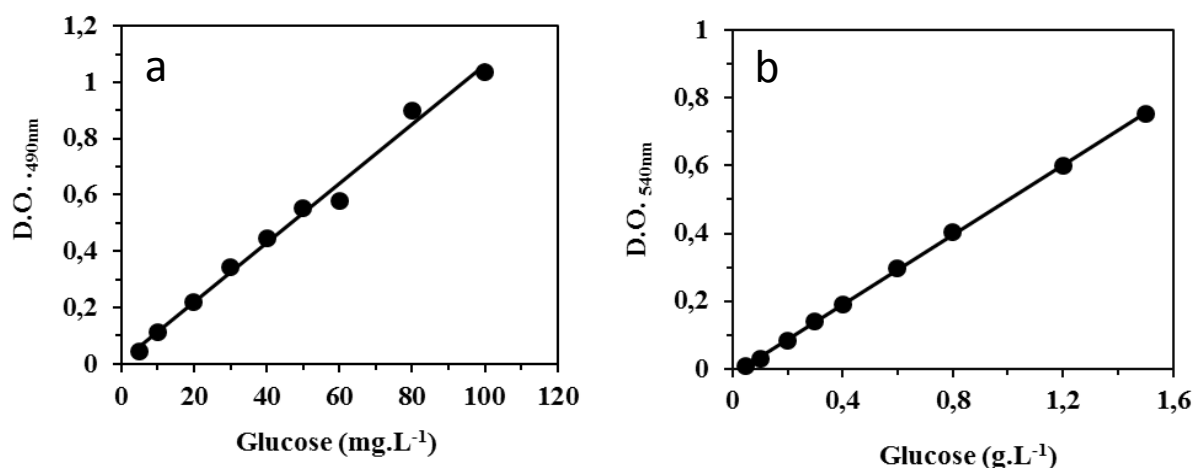
Por ser também um microrganismo que sintetiza açúcares (Spolaore *et al.*, 2006), considerou-se a microalga *Scenedesmus obliquus* como um modelo apropriado para estudar a produção de bioetanol.

3.1 Optimização de Metodologias e Tecnologias de Processamento de Biomassa de *Scenedesmus obliquus* Para Produção de Bioetanol

3.1.1 Avaliação de Factores que Influenciam Metodologias Colorimétricas Para a Determinação de Açúcares

A determinação colorimétrica do teor de açúcares na microalga foi realizada por dois métodos: o do reagente FS e o do reagente de DNS. O primeiro método permite determinações entre os 10 e os 100 mg.L⁻¹ de açúcares totais, em amostras que podem conter monossacáridos e açúcares enquanto que o segundo permite determinar apenas açúcares redutores, assegurando, por exemplo, a quantificação de glucose entre 0,05 e 1,5 g.L⁻¹.

Os dois métodos apresentaram boa sensibilidade com ajuste linear nas gamas de concentração testadas (Fig. 3.1).



Método de análise	Declive da recta	Ordenada na origem	R ²
Fenol-sulfúrico	0,0105	0,0106	0,9909
DNS	0,5168	-0,0165	0,9998

Figura 3.1 – Curvas de calibração com glucose para os métodos de avaliação do teor em açúcares totais com reagente fenol-sulfúrico (a) e açúcares redutores com reagente de ácido 3,5-dinitrossalicílico (b). Os resultados representam a média de determinações em triplicado.

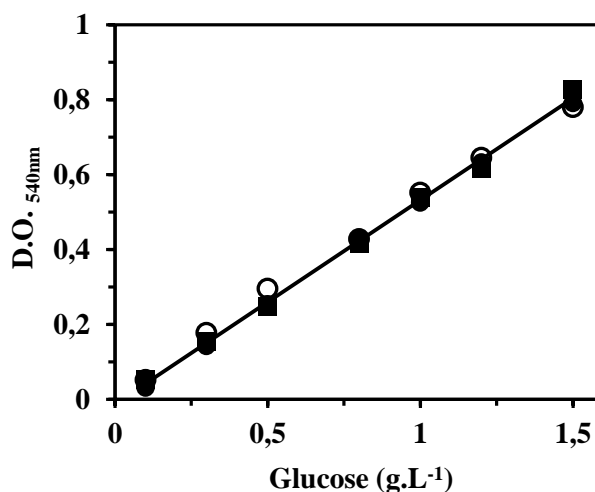
3.1.1.1 pH da Amostra

Dado que, grande parte dos ensaios de extração de açúcares da biomassa de microalga foram efectuados em concentrações elevadas de ácido, e os resultados das leituras espectrofotométricas obtidos para a determinação com reagente de DNS foram inferiores a 0,010, tornou-se necessário avaliar modos de ultrapassar esta situação.

Como a reacção química envolvida neste método ocorre em meio alcalino, optou-se por tentar neutralizar o efeito do ácido das amostras com hidróxido de sódio em dois pontos do procedimento analítico (secção 2.3.6.5). Segundo Miller (1959), com o aumento da concentração de hidróxido de sódio dever-se-á observar o aumento da intensidade da cor após aquecimento a 100 °C.

A adição de uma pastilha de NaOH a soluções de glucose em ácido sulfúrico 2N foi suficiente para anular o efeito do ácido, uma vez que a curva obtida se sobrepôs à curva de calibração padrão (Fig. 3.2).

Face aos resultados obtidos decidiu-se que, em qualquer análise de amostras ácidas pelo método do reagente de DNS, se procederia a uma neutralização prévia do volume de amostra necessário com 1 pastilha de hidróxido de sódio.



Hidróxido de sódio	Declive da recta	Ordenada na origem	R ²
-	0,5168	-0,0165	0,9998
Uma pastilha	0,5495	-0,0129	0,9967
Uma pastilha + 5 mL NaOH 10% (m.v ⁻¹)	0,5180	0,0187	0,9972

Figura 3.2 - Curvas de calibração para glucose no método do reagente de DNS: normal (●), com ácido e uma pastilha de NaOH (○) e com ácido, uma pastilha e 5 mL de NaOH 10% (m.v⁻¹) (■). Os resultados representam a média de determinações em triplicado.

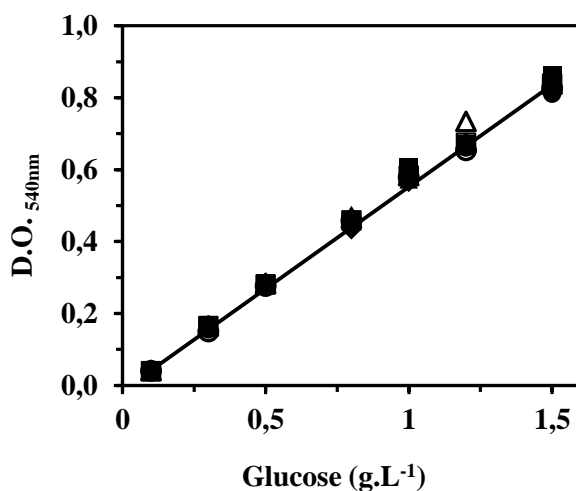
Em relação ao método do reagente FS, a adição de 5 mL de ácido sulfúrico concentrado (95 – 97%) implica que o meio de reacção seja já fortemente ácido não sendo afectado pelo baixo valor de pH das amostras.

3.1.1.2 Presença de Sais

Da neutralização, com hidróxido de sódio, das amostras ácidas para determinação de açúcares redutores, ocorreu a formação de elevadas concentrações de sulfato ou de cloreto de sódio. Foi então necessário estudar o efeito da concentração destes sais no método colorimétrico.

Para tal, foram determinadas curvas de calibração para glucose no método do reagente de DNS para soluções com concentrações definidas de sulfato de sódio (0 - 30 g.L⁻¹). As curvas de calibração obtidas apresentaram linearidade até à concentração de glucose 1,5 g.L⁻¹ (Fig. 3.3) com sobreposição à curva de calibração padrão, o que permitiu concluir que a presença deste sal não revela qualquer efeito interferente no presente método, tal como já sugeriam os resultados dos testes de alcalinização

(Fig. 3.2). Concentrações acima de 30 g.L^{-1} não foram consideradas devido à necessidade de diluição de amostras com concentrações elevadas de açúcares.



Sulfato de sódio	Declive da recta	Ordenada na origem	R^2
0	0,5168	-0,0165	0,9998
0,7	0,5592	-0,0074	0,9969
3	0,5654	-0,0098	0,9974
6	0,5835	-0,0093	0,9972
15	0,5723	-0,0073	0,9986
20	0,5717	-0,0039	0,9983
30	0,5870	-0,0087	0,9947

Figura 3.3 - Curvas de calibração para glucose obtidas com o método do reagente de DNS para diferentes concentrações de sulfato de sódio: 0 (♦) 0,7 (●), 3 (○), 6 (■), 15 (□), 20 (▲) e 30 g.L^{-1} (△). Os resultados representam a média de determinações em duplicado.

Nos ensaios com cloreto de sódio foram preparadas soluções com concentrações deste sal até 40 g.L^{-1} e $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ de glucose (Fig. 3.4). Embora se tenham observado oscilações no valor da densidade óptica da solução, depois de executado o método, estas não foram muito expressivas e parecem indicar não haver interferência.

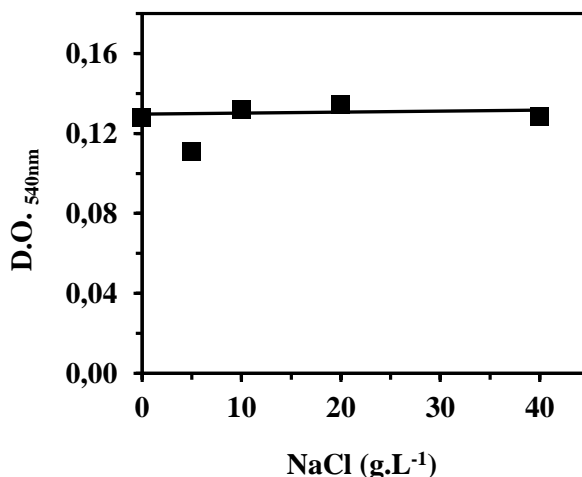


Figura 3.4 - Influência da presença de cloreto de sódio (■) no método do reagente de DNS. Os resultados representam a média de determinações em duplicado.

Embora não houvesse necessidade de alcalinizar as amostras para as determinações pelo método do reagente FS, o efeito dos dois sais foi também avaliado para este método. Para tal, foram preparadas soluções com glucose (60 mg.L⁻¹) e diferentes concentrações de sulfato de sódio e cloreto de sódio entre 5 e 40 g.L⁻¹ (Fig. 3.5).

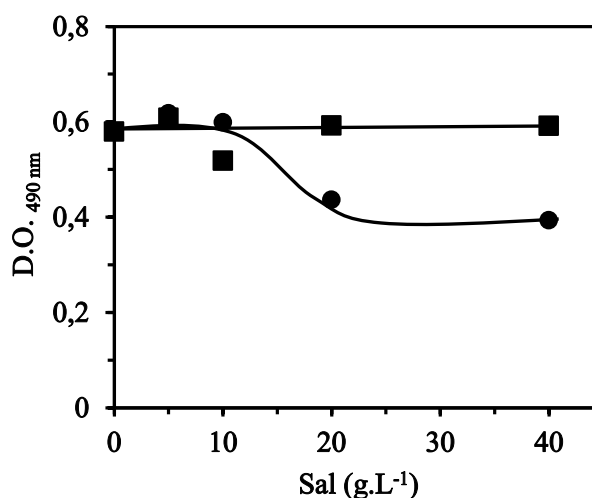


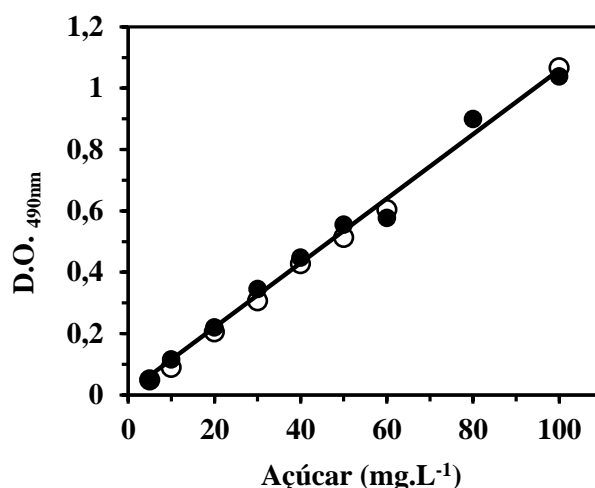
Figura 3.5 - Influência da presença de sulfato de sódio (●) e cloreto de sódio (■) no método do reagente fenol-sulfúrico. Os resultados representam a média de determinações em duplicado.

O cloreto de sódio parece não apresentar grande interferência no método do reagente fenol-sulfúrico. Nos valores obtidos com adição de sulfato de sódio parece verificar-se um efeito negativo para concentrações de sal acima de 10 g.L⁻¹. Contudo, este método exige diluições 10x superiores às do método do reagente de DNS pelo que nunca serão atingidos níveis de concentração de sal muito elevados.

3.1.1.3 Grau de Polimerização do Açúcar

O método do reagente fenol-sulfúrico permite determinar a concentração total de açúcares incluindo açúcares complexos. Contudo, o valor de absorvância pode variar com a natureza do açúcar em estudo, como descrito pelo autor do método (Dubois *et al.*, 1956). Deste modo, foi necessário avaliar a eficiência da análise para amido, um polímero de glucose, que foi seleccionado por ser a forma preferencialmente acumulada pelas microalgas verdes, entre as quais a *Scenedesmus obliquus* (Kim *et al.*, 2007).

Sendo o amido um açúcar insolúvel em água fria, foi necessário proceder ao seu aquecimento para se observar total solubilização e permitir a preparação de soluções homogêneas de concentrações entre 5 e 100 mg.L⁻¹ que foram então analisadas. Os valores de absorvância das amostras apresentaram linearidade e sobreposição à curva de calibração determinada para soluções de glucose (Fig. 3.6). Este resultado permitiu concluir que o método é eficiente para açúcares com maior grau de polimerização permitindo realizar uma quantificação correcta.



Açúcar	Declive da recta	Ordenada na origem	R ²
Glucose	0,0105	-0,0106	0,9909
Amido	0,0102	-0,0016	0,9993

Figura 3.6 - Curvas de calibração para glucose (●) e amido (○) na determinação do teor de açúcares totais pelo método do FS. Os resultados representam a média de determinações em duplicado.

3.1.2 Ruptura Celular e Extracção de Açúcares da Microalga *Scenedesmus obliquus*

A microalga *Scenedesmus obliquus* acumula açúcares, sob a forma de amido, no meio intracelular, pelo que, tendo em vista a produção de bioetanol a partir da biomassa desta microalga, se torna necessário proceder à ruptura da parede celular para extrair os açúcares.

Os ensaios de ruptura foram realizados, com cerca de 2,5 g de biomassa microalgal húmida (ou quantidade equivalente de biomassa seca – 0,5 g) e por isso os resultados obtidos para os métodos colorimétricos são apresentados em percentagem mássica (grama equivalente de glucose por grama de biomassa seca de microalga (% g eq_{glu}·g bs⁻¹)).

3.1.2.1 Selecção do Método de Ruptura Celular

Tendo em vista a eficiência energética do processo global, a primeira abordagem foi o processamento de biomassa microalgal concentrada por centrifugação a 18 592 g (com um teor de humidade, aproximado, de 75% m.m⁻¹), evitando-se assim o gasto de energia na secagem.

A ruptura da parede celular da microalga *Scenedesmus obliquus* foi realizada com dois tipos de métodos distintos: físicos (homogeneização, sonicação, abrasão com esferas de vidro e temperatura) e associação de métodos químicos e físicos (aquecimento em presença de um agente químico).

A quantidade de açúcares totais detectada nos extractos das amostras, provenientes do mesmo lote de microalga, foi utilizada como medida do sucesso do método utilizado. Os resultados obtidos encontram-se na Fig. 3.7.

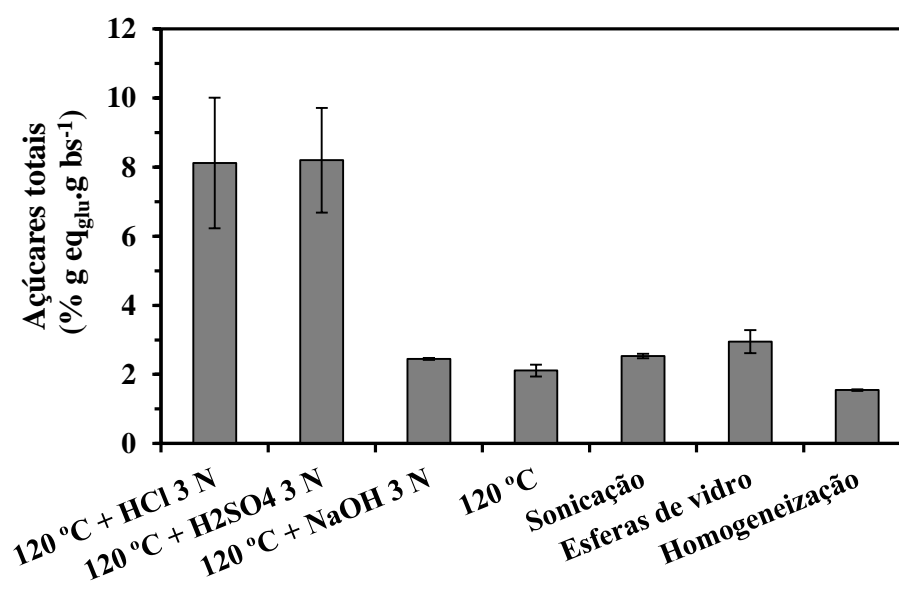


Figura 3.7 - Ruptura celular e extracção de açúcares de biomassa húmida de *Scenedesmus obliquus* por diferentes métodos. Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.

Os métodos físicos de ruptura celular da biomassa revelaram ser os menos eficientes, não apresentando extracções de açúcares da biomassa acima dos 3 % (g eq_{glu}·g bs⁻¹) quando comparados com os de temperatura (120 °C) associada à hidrólise ácida em que se obteve 8,20 e 8,12 % (g eq_{glu}·g bs⁻¹) com ácido sulfúrico e clorídrico, respectivamente.

O ensaio realizado a 120 °C com NaOH 3N não apresentou diferença significativa em relação à extracção apenas por métodos físicos (2,45 % (g eq_{glu}·g bs⁻¹)). Este resultado não correspondeu ao esperado, já que o tratamento alcalino da biomassa permite destruir as ligações das fibras de celulose e hemicelulose da parede celular, presentes nas microalgas, tornando os açúcares intracelulares acessíveis (Harun *et al.*, 2010b; Takeda, 1996)). O facto de a quantidade de açúcares extraídos da biomassa tratada com hidróxido de sódio ter sido apenas ligeiramente superior ao ensaio realizado nas mesmas condições com água poderá indicar degradação dos açúcares devido a excesso de hidróxido de sódio, fenómeno já descrito por alguns autores (Hendriks e Zeeman, 2009).

Em relação à ruptura por calor e ácido, e dado que o aquecimento é uma operação que introduz gastos em qualquer processo, foi avaliada a possibilidade de extracção dos açúcares a temperaturas abaixo dos 120 °C (Quadro 3.1) e à pressão normal

Quadro 3.1 – Efeito da temperatura na extracção de açúcares de biomassa microalgal húmida a diferentes temperaturas, durante 30 minutos.

Temperatura do tratamento (°C)	Açúcares totais (% (g eq _{glu} ·g bs ⁻¹))
58	1,27
82	5,13
120	8,20

A utilização de uma temperatura elevada repercutiu-se num ataque mais eficiente da biomassa pelo ácido, comportamento concordante com trabalhos prévios realizados com microalgas. Nguyen *et al* (2009) observaram que, na hidrólise de biomassa de *Chlamydomonas reinhardtii* com ácido sulfúrico 1 N, o aumento de temperatura de 100 °C para 110 °C permite um aumento de 20 % na extracção de açúcares.

Considerou-se então 120 °C como a temperatura adequada para a extracção e hidrólise química de açúcares da microalga.

3.1.2.2 Efeito da Humidade da Biomassa na Ruptura Celular

Uma vez que a extracção de açúcares de biomassa húmida foi reduzida (< 9 %), foram realizados ensaios similares com biomassa seca em proporção idêntica à húmida.

Os resultados obtidos mostraram que a secagem da biomassa influenciou positivamente a extracção dos açúcares contidos na biomassa e o processamento a quente com ácido permitiu obter mais 55 % de açúcares (Fig. 3.8). Estes resultados parecem indicar que a secagem da biomassa fragiliza a parede celular que, por acção de temperatura e pressão, fica comprometida ao ponto de permitir maior libertação de açúcares.

Os valores obtidos para a extracção com hidróxido de sódio, não foram expressivamente diferentes dos alcançados com biomassa húmida nas mesmas condições apesar da parede celular se encontrar mais fragilizada. Este resultado poderá confirmar a hipótese de degradação de açúcares durante tratamento alcalino forte.

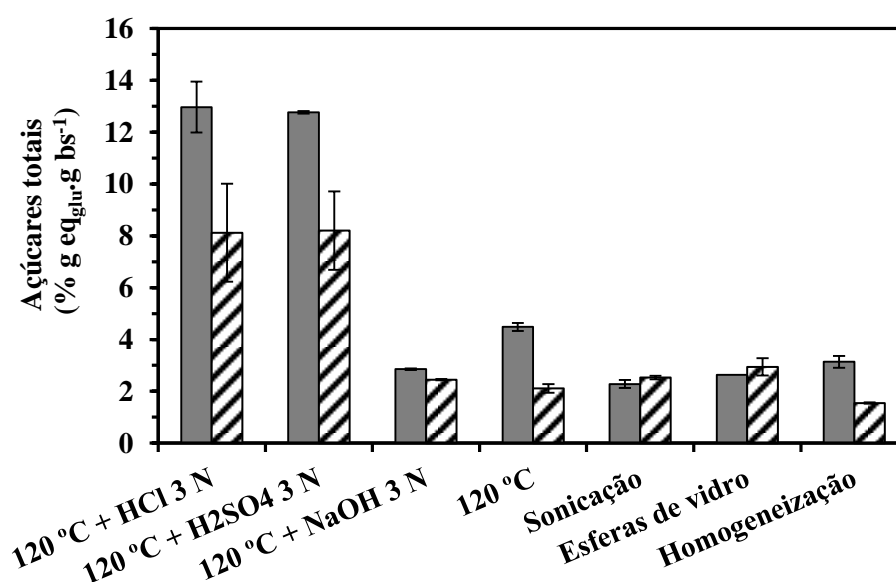


Figura 3.8 - Ruptura celular e extracção de açúcares de biomassa seca (■) e húmida (▨) de *Scenedesmus obliquus* por métodos físicos e por métodos físico-químicos. Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.

Não se registou uma influência significativa da secagem no processamento por sonicação e com esferas de vidro.

Na realidade, os métodos de ruptura celular deverão ser quase específicos para cada espécie de microalga devido às características únicas da sua parede celular e a microalga *Scenedesmus obliquus* tem sido descrita como apresentando uma resistência à ruptura celular superior à de outras microalgas, pois possui uma parede celular multicamada em que a camada interior é formada por celulose envolvida por uma matriz hemicelulósica. A camada exterior possui 3 sub-camadas contendo

esporopolenina (Shelef e Soeder, 1978), um politerpeno, também presente nos grãos de pólen, que confere rigidez elevada e protecção ao ataque químico (Burczyk e Dworzanski, 1988; Lee *et al.*, 2010b, Mussgnug *et al.*, 2010, Raposo *et al.*, 2001). O processo de secagem da biomassa poderá ter conduzido a modificações na estrutura da esporopolenina na parede celular, como já foi descrito por Raposo *et al.*, (2001) além de que, durante a secagem, a água é retirada dos poros existentes entre as microfibras de celulose, modificando irreversivelmente a sua estrutura supramolecular e conduzindo ao aparecimento de zonas amorfas onde ocorre a acumulação de tensões entre as fibras. Estas tensões retiram elasticidade às fibras quando estas são expostas a meios aquosos tornando-se assim mais susceptíveis a ataques por parte de ácidos (Kontturi e Vuorinen, 2008, Hakkou *et al.*, 2006, Benko *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos nas secções anteriores levaram a que se optasse por realizar a ruptura/hidrólise da microalga *Scenedesmus obliquus* com ácido sulfúrico em autoclave, a 120 °C durante 30 min.

3.1.2.3 Optimização da Ruptura/Extracção com Ácido Sulfúrico

Dos métodos de ruptura celular, a hidrólise ácida a 120 °C foi a mais eficiente, pelo que a selecção do ácido a utilizar na optimização do método se baseou numa questão de processo. O tratamento da biomassa com qualquer dos ácidos levaria a uma concentração elevada de sais no hidrolisado final, o que poderia comprometer a fermentação alcoólica devido ao choque osmótico. O ácido sulfúrico apresenta a vantagens de o ião sulfato poder ser removido por precipitação com compostos de reduzida toxicidade para microrganismos, e por ser um nutriente presente no meio de cultura de leveduras.

Tendo seleccionado então o ácido sulfúrico para o pré-tratamento da biomassa, tornou-se necessário optimizar as condições da ruptura/hidrólise para aumentar o rendimento em açúcares. Na optimização foram tidos em consideração o efeito da concentração de ácido e da concentração de biomassa.

Nesta fase do trabalho, e na tentativa de avaliar o nível de polimerização dos açúcares extraídos, os extractos, foram também analisados pelo método do reagente de DNS, que permite apenas identificar monossacáridos redutores.

Além disso, todos os resultados de ensaios de hidrólise foram comparados com os valores obtidos por hidrólise ácida quantitativa (HAQ; secção 2.3.6.3) para o mesmo lote de alga, servindo como uma medida do teor máximo de açúcares extraíveis. Este é o procedimento geralmente usado para quantificar açúcares em matérias-primas lenhocelulósicas, altamente resistentes à acção de químicos e com composição algo similar à descrita para as algas, em que se inclui a presença de celulose e hemicelulose. Neste método, a primeira hidrólise, com ácido a 76 % m.m⁻¹, ataca as fibras dos

polissacáridos, solubilizando-as, enquanto que a segunda, com 4 % m.m⁻¹ de ácido, hidrolisa-as, minimizando a decomposição da glucose e outros monossacáridos (Hoebler *et al.*, 1989).

a) Influência da Concentração de Ácido

Para analisar a influência da concentração de ácido, foi realizado um ensaio preliminar de hidrólise com ácido sulfúrico em autoclave, usando biomassa húmida e seca.

O estudo preliminar do efeito da concentração de ácido na eficiência da extracção encontra-se apresentado na Fig. 3.9. Tal como observado na secção anterior, a biomassa seca apresentou resultados muito superiores aos obtidos com biomassa húmida para as mesmas concentrações de ácido.

O aumento da concentração de ácido teve como consequência a aproximação da concentração dos açúcares redutores à dos açúcares totais, provavelmente devido a aumento do nível de hidrólise.

Em alguns casos, o teor em açúcares redutores foi superior ao dos totais, o que poderá ter resultado do facto de a coloração por reacção com o reagente de DNS depender do tipo de monossacárido determinado e ainda da eventual presença, no extracto, de produtos de degradação reactivos (Decker *et al.*, (2009)).

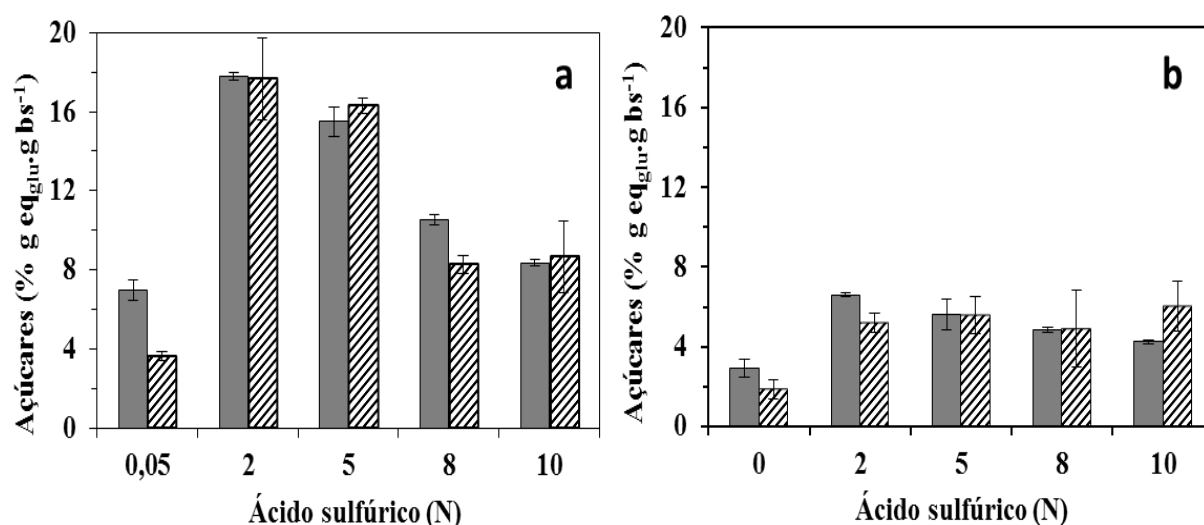


Figura 3.9 - Extracção de açúcares com o tratamento de biomassa húmida (a) e seca (b) de *Scenedesmus obliquus* com diferentes concentrações de ácido sulfúrico (açúcares totais ■, açúcares redutores ▨). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.

O aumento da severidade das condições de hidrólise teve como consequência um decréscimo nos açúcares totais, mais acentuado nos ensaios com biomassa seca, que se poderá dever a ataque químico dos próprios açúcares. A extracção máxima de açúcares foi conseguida com ácido sulfúrico 2 N, com

uma eficiência de recuperação, em relação ao valor obtido por HAQ de 75,7 % de açúcares da biomassa húmida e de 89,9% de açúcares da biomassa seca (Fig. 3.9; Quadro 3.2).

Quadro 3.2 - Teores em açúcares resultantes da HAQ. Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.

	Biomassa húmida	Biomassa seca
Açúcares totais (% (g eq _{glu} .g bs ⁻¹))	8,70	19,80
Glucose (% (g eq _{glu} .g ⁻¹ bs))	5,01	10,82
Outros monossacáridos (% (g eq _{glu} .g bs ⁻¹))	3,71	6,08

Os hidrolisados de alga foram também analisados por HPLC (numa coluna Aminex HPX-87H) e, em todos os casos, foram detectados apenas 2 picos, com áreas significativas na zona de eluição de açúcares, que corresponderiam à glucose (14,6 min), e galactose, manose ou xilose (15,5 a 15,7 min), pois estes compostos têm tempo de eluição demasiado próximo para se observar separação efectiva de picos. As proporções relativas entre os 2 picos encontrados indicam sempre uma quantidade bastante superior de glucose (> 50% da área total), o que corresponde ao esperado, uma vez que a glucose foi já identificada como o composto dominante (70-80%) na parede celular da microalga em estudo. Não obstante, alguns autores identificaram também manose e galactose (Takeda, 1993, 1996, Řezanka, 1983) e, arabinose, xilose e ramnose (Soeder e Hegenald 1998), que serão resultantes da hidrólise de polissacáridos da parede celular (Soeder e Hegenald, 1998, Hakkou *et al.*, 2006, Benko *et al.*, 2007), embora nas amostras de hidrolisado de *Scenedesmus obliquus* não se tenha detectado arabinose e ramnose.

Dado que não foi possível separar a galactose, a manose e a xilose, não se puderam avaliar as proporções relativas de cada um destes açúcares e a sua contribuição para o pico, o que invalidou a construção de rectas de calibração. Assim, usou-se sempre a recta obtida com glucose, definindo o teor global destes 3 açúcares em teor equivalente de glucose.

O ácido 0,05 N foi a concentração que menos açúcares extraiu, provavelmente por ser insuficiente para solubilizar e hidrolisar as fibras de celulose da parede celular, pois a percentagem de glucose na amostra era muito baixa (Fig. 3.10). Com as restantes concentrações de ácido, a percentagem de glucose nas amostras variou entre os 54 e os 62 % do teor global de açúcares detectados por HPLC, numa razão sempre inferior para os ensaios com biomassa húmida, tal como observado com a HAQ. (64% em glucose com biomassa seca) (Quadro 3.2).

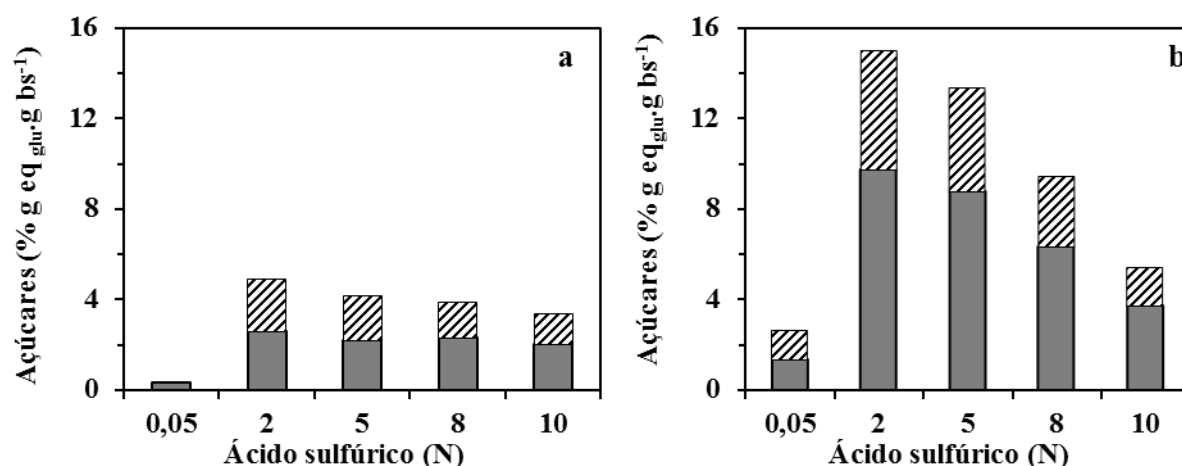


Figura 3.10 – Teor em monossacáridos extraídos de biomassa húmida (a) e seca (b) de *Scenedesmus obliquus* em função da concentração de ácido sulfúrico (glucose (■); outros (▨)).

A análise por HPLC permitiu ainda determinar nos hidrolisados a presença de produtos de degradação dos açúcares (furfural, hidroximetilfurfural (HMF), ácido acético e ácido fórmico) (Fig. 3.11). O furfural e o HMF resultam da degradação da celulose e dos xilanos da hemicelulose, sendo o ácido fórmico e o ácido acético os produtos finais da degradação dos primeiros (Fig. 3.12). Foram também detectados ácidos orgânicos de cadeia curta (propiónico, láctico e butírico produzidos provavelmente em vias metabólicas da alga. Todos estes compostos foram já referenciados como podendo exercer efeitos nocivos na capacidade fermentativa das leveduras (Delgenes *et al.*, 1996; Palmqvist e Hahn-Hagerdal 2000) (Quadro 3.3).

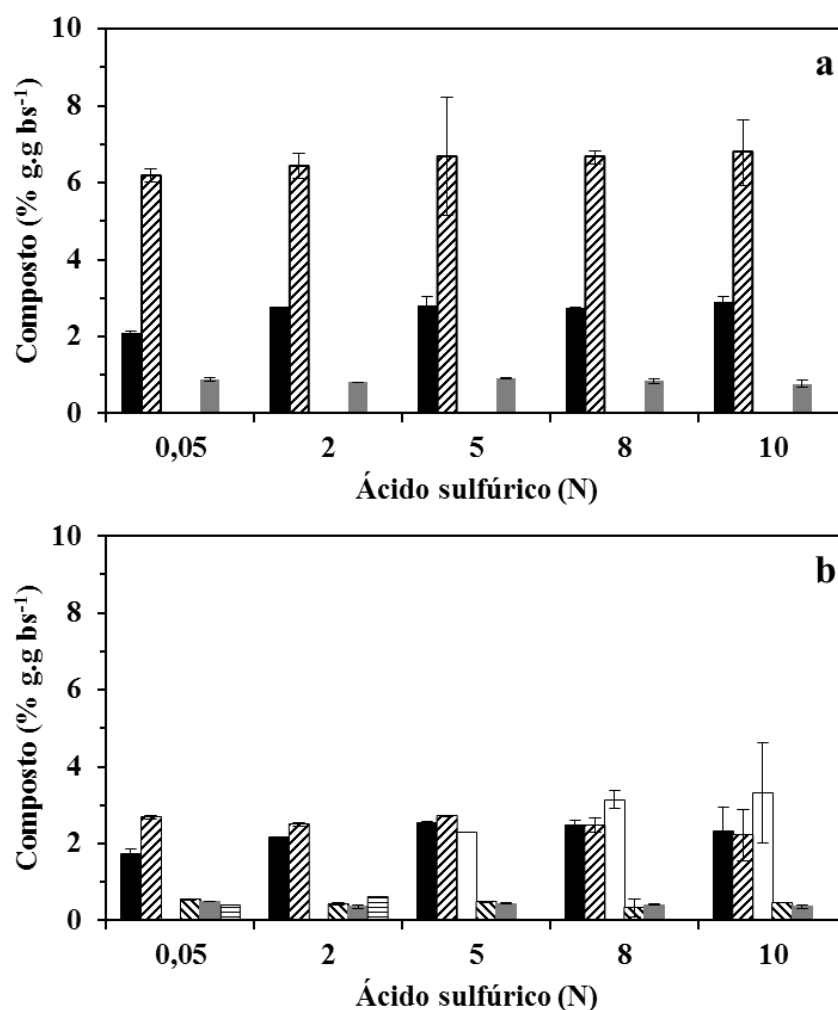


Figura 3.11 - Teor de produtos de degradação de açúcares e de ácidos voláteis nos extractos de biomassa húmida (a) e seca (b) de *Scenedesmus obliquus* em função da concentração de ácido (ácido acético (■), ácido láctico (▨), ácido fórmico (□), ácido propiónico (▩), ácido butírico (■) e HMF (▤)). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.

Em nenhum outro dos ensaios realizados com biomassa húmida, com excepção do ensaio com menor concentração, se verificou uma contribuição activa do ácido para a formação dos compostos, uma vez que a sua quantidade se manteve praticamente inalterada com o aumento da concentração de ácido.

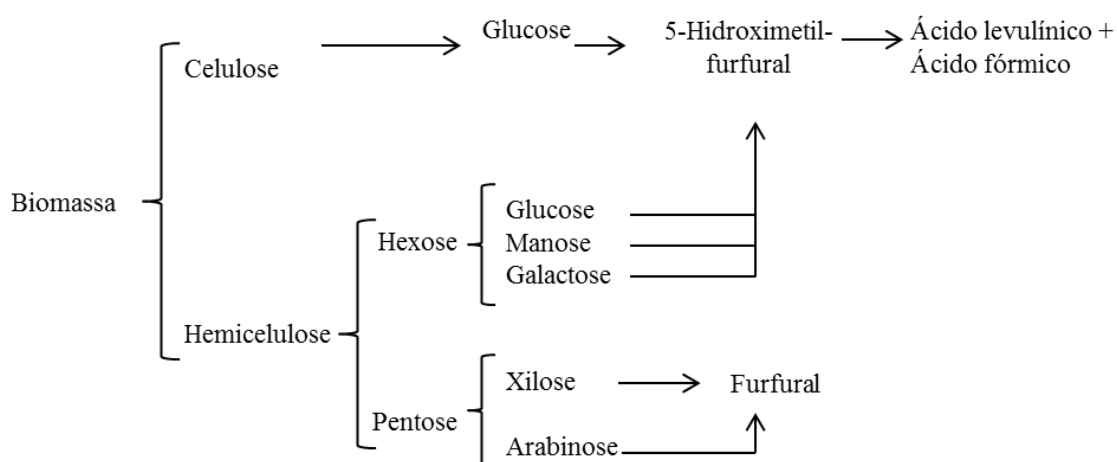
Quadro 3.3 - Limites de concentração de produtos de degradação de açúcares tolerável por microrganismos.

Composto	Limite (g.L ⁻¹)	Organismo	Referência
Ácido acético	6,01	<i>S. cerevisiae</i>	(Narendranath <i>et al.</i> , 2001)
	10,03	<i>S. cerevisiae</i>	(Thomas <i>et al.</i> , 2002)
	5	<i>P. stipitis</i>	(Delgenes <i>et al.</i> , 1996)
Ácido láctico	25,04	<i>S. cerevisiae</i>	(Narendranath <i>et al.</i> , 2001)
	49,36	<i>S. cerevisiae</i>	(Thomas <i>et al.</i> , 2002)
Ácido propiónico	2 ^{a)}	<i>S. cerevisiae</i>	(Savard <i>et al.</i> , 2002)
Ácido fórmico	4,6	<i>S. cerevisiae</i>	(Larsson <i>et al.</i> , 1999)
HMF	15,13	<i>S. cerevisiae</i>	(Ngang <i>et al.</i> , 2006)

^{a)} Efeito inibidor apenas na presença de ácido acético 3 g.L⁻¹ e ácido láctico 7 g.L⁻¹.

Embora se tenha observado uma maior diversidade de produtos de degradação nos ensaios com biomassa seca, a concentração destes foi, no global, inferior à registada no hidrolisado da biomassa húmida.

Em concentrações elevadas de ácido, o HMF pode ser degradado a ácido fórmico, como descrito por Girisuta *et al.*, (2006) (Fig. 3.12), e talvez por isso se tenha observado, nos ensaios com biomassa seca, um aumento do teor em ácido fórmico para concentrações de ácido superiores a 2N em detrimento da detecção de HMF, que ocorreu a 0,05 e 2N.

**Figura 3.12** – Degradação de açúcares em condições ácidas. Adaptado de Girisuta *et al.*, (2006).

Os ensaios preliminares confirmaram a eficiência da extracção de açúcares em biomassa seca e permitiram identificar que esta é mais eficiente para concentrações menores de ácido.

Com o objectivo de determinar com um pouco mais de exactidão qual a concentração de ácido sulfúrico mais adequada decidiu-se estudar mais níveis de concentração.

O lote de microalga utilizado neste ensaio possuía 31,8 % ($\text{g eq}_{\text{glu}} \cdot \text{g bs}^{-1}$) em açúcares totais e (Quadro 3.4) com 63,9 % de glucose. Estes resultados mostram realmente que lotes de alga colhidos em estados fisiológicos diferentes apresentam teores de açúcares diferentes.

Quadro 3.4 - Teores em açúcares resultantes da HAQ. Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.

Biomassa seca	
Açúcares totais (% ($\text{g eq}_{\text{glu}} \cdot \text{g bs}^{-1}$))	31,76
Glucose (% ($\text{g eq}_{\text{glu}} \cdot \text{g}^{-1} \text{ bs}$))	14,70
Outros monossacáridos (% ($\text{g eq}_{\text{glu}} \cdot \text{g bs}^{-1}$))	8,31

Tal como anteriormente observado, a maior extracção de açúcares foi obtida com a concentração de ácido sulfúrico 2 N (Fig. 3.13), tendo-se extraído 96 % de açúcares totais relativamente ao obtido com a HAQ. Este resultado foi idêntico ao conseguido no ensaio anterior realizado com alga seca proveniente de outro lote, colhido numa fase diferente de crescimento, o que poderá indicar que a parede celular era semelhante.

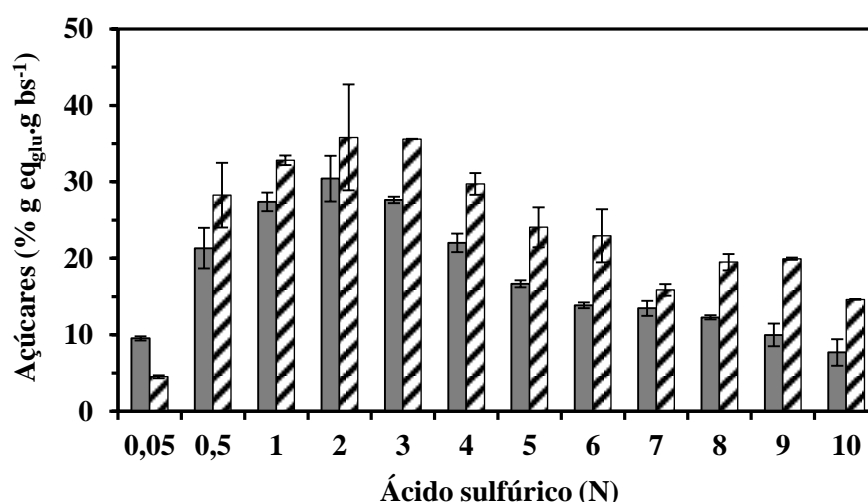


Figura 3.13 - Extracção de açúcares com o tratamento de biomassa seca de *Scenedesmus obliquus* com diferentes concentrações de ácido sulfúrico (açúcares totais) (■), açúcares redutores (▨). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.

Também neste caso a concentração de açúcares redutores foi, no geral, superior à concentração em açúcares totais (Fig. 3.13). Só para a concentração de ácido sulfúrico 0,05 N é que a determinação de açúcares redutores foi inferior à dos açúcares totais devido provavelmente ao maior grau polimerização dos açúcares.

A concentração de ácido teve influência na hidrólise dos polissacáridos, havendo inicialmente um aumento da quantidade relativa de glucose com o aumento da concentração do ácido, após o que se observou decréscimo na quantidade de açúcares totais com manutenção da proporção de glucose em cerca de 60% (Fig. 3.14).

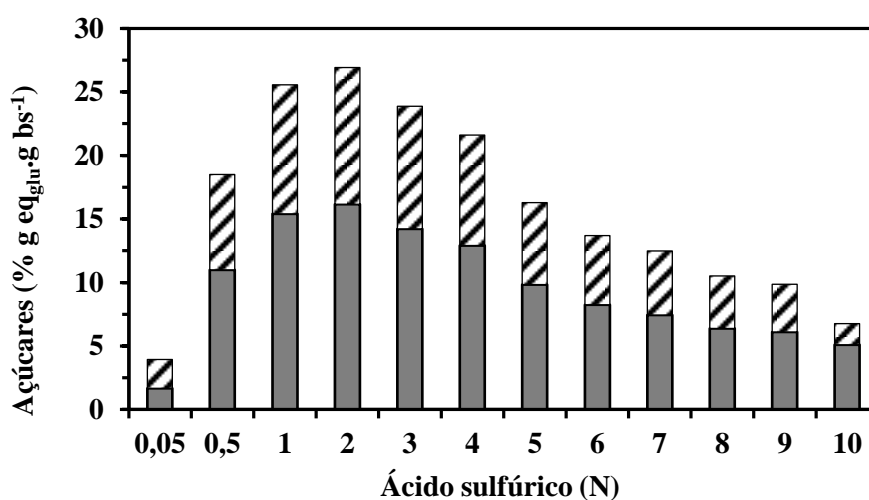


Figura 3.14 - Monossacáridos extraídos da biomassa seca de *Scenedesmus obliquus* em função da concentração de ácido sulfúrico: glucose (■) e outros (▨).

Neste lote de microalga observou-se aumento do teor em compostos de degradação de açúcares com o aumento da concentração de ácido (Fig. 3.15). À semelhança do observado no ensaio preliminar com biomassa seca, o HMF apenas foi detectado até à concentração máxima de 2 N e a concentração de ácido fórmico aumentou nos extractos com o decréscimo do teor em glucose.

Também o ácido propiónico só foi detectado para concentrações baixas de ácido.

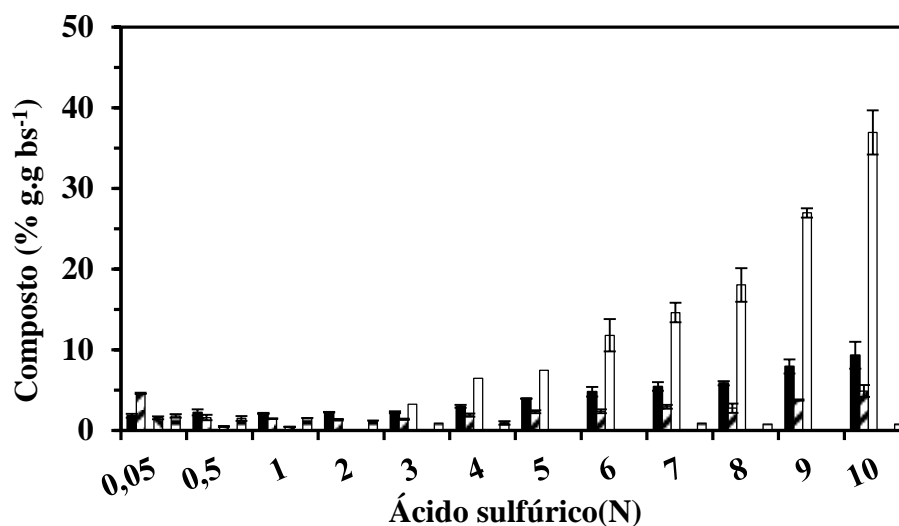


Figura 3.15 - Teor de produtos de degradação de açúcares e de ácidos voláteis nos extractos de biomassa seca de *Scenedesmus obliquus* em função da concentração de ácido (ácido acético (■), ácido láctico (▤), ácido fórmico (□), ácido propiónico (▥), ácido butírico (■) e HMF (▨)). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.

b) Influência da Concentração de Biomassa

O segundo parâmetro com influência no processo de extracção de açúcares e que foi estudado, foi a concentração de biomassa, com o objectivo de tentar obter extractos com concentrações de açúcares que permitam uma produção sustentável de etanol.

O lote de microalga utilizado neste ensaio possuía um teor de 31,8 % ($\text{g eq}_{\text{glu}} \cdot \text{g bs}^{-1}$) em açúcares totais, determinado por HAQ.

Com o aumento da concentração de biomassa observou-se um aumento da concentração de açúcares totais no hidrolisado com perda de eficiência de extracção dos açúcares (Fig. 3.16).

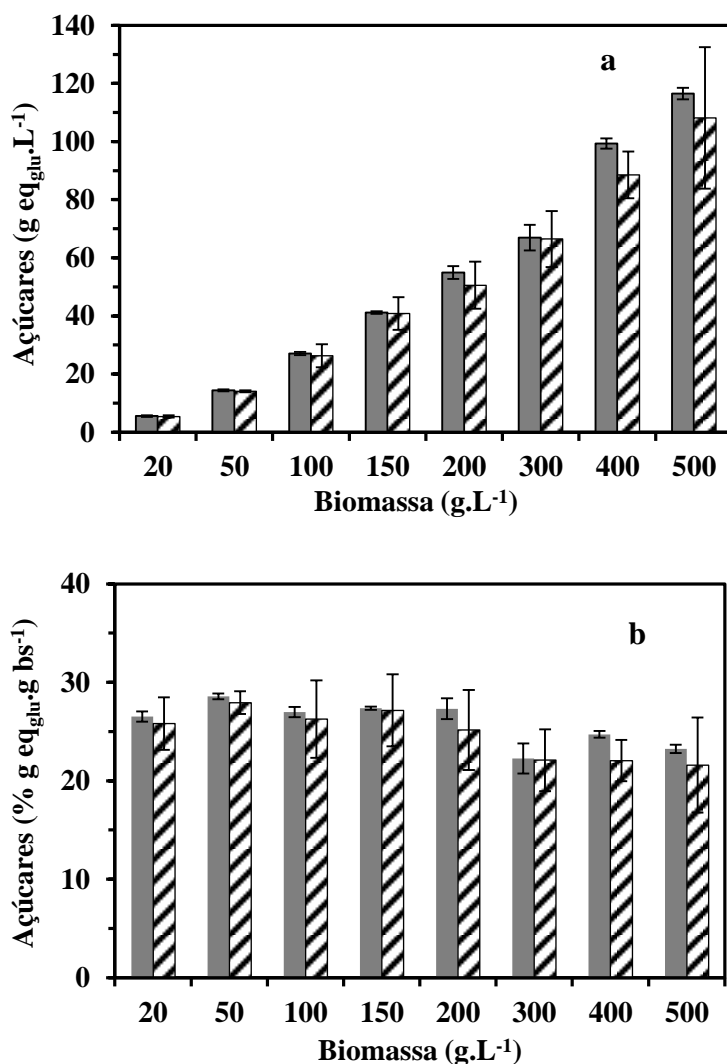


Figura 3.16 - Extracção de açúcares de biomassa seca de *Scenedesmus obliquus* hidrolisada em ácido sulfúrico 2 N em função da concentração de biomassa. (açúcares totais: ■, açúcares redutores: ▨). Concentração de açúcares no hidrolisado (a) e extracção de açúcares por quantidade de biomassa (b). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.

A extracção de açúcares foi mais eficiente no ensaio com 50 g.L⁻¹ de biomassa, correspondendo a 28,6 % g eq_{glu}.g bs⁻¹ (89,9% da HAQ). No ensaio com 500 g.L⁻¹ de biomassa o teor de açúcares totais extraídos foi de 23,3 % (g eq_{glu}.g bs⁻¹) (73,1% da HAQ) mas o extracto obtido continha a concentração mais elevada de açúcares (116 g.L⁻¹).

Não foram observadas diferenças significativas nas proporções relativas de glucose nos extractos (Fig. 3.17), reconfirmando que, com boa eficiência de extracção, a glucose representa sempre cerca de 60% do total de monossacáridos.

Neste caso, a concentração de açúcares redutores nunca foi superior à concentração de açúcares totais tal como já se havia observado com biomassa seca para uma concentração de 2N.

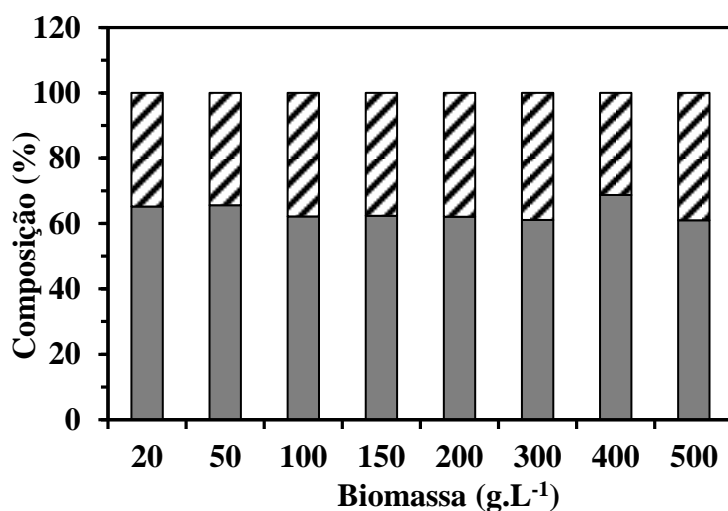


Figura 3.17 - Composição em glucose (■) e outros açúcares (▨). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.

Com o aumento da concentração de biomassa, ocorreu também acumulação de produtos de degradação e de ácidos voláteis (Fig. 3.18). Os valores de concentração destes compostos, presentes no hidrolisado obtido a partir com a maior concentração de biomassa, eram da ordem de 2,4 g.L⁻¹ de ácido acético, 1,52 g.L⁻¹ de ácido láctico, 0,63 g.L⁻¹ de ácido propiônico e 2,08 g.L⁻¹ de HMF, valores inferiores às concentrações a partir das quais foi reportada inibição de fermentação (Quadro 3.3).

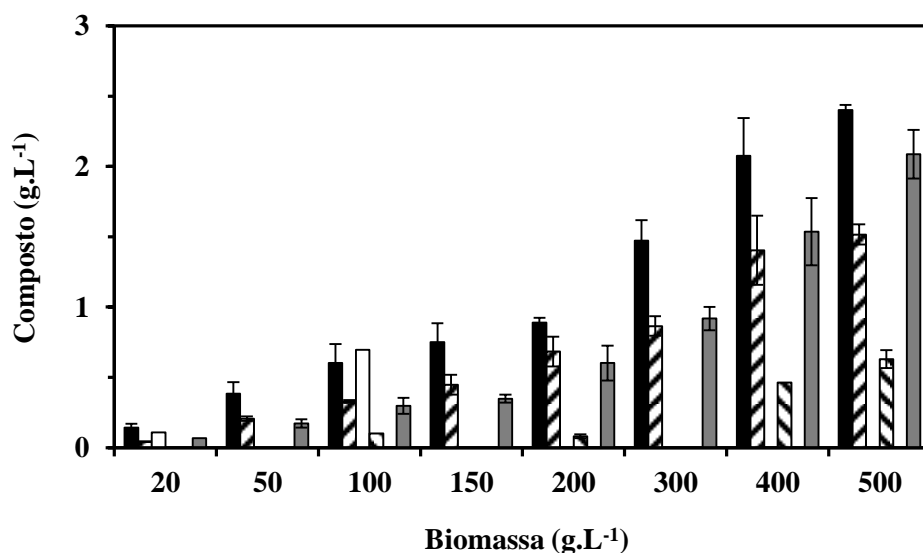


Figura 3.18 - Teor de produtos de degradação de açúcares em função da concentração de biomassa: ácido acético (■), ácido láctico (▨), ácido fórmico (□), ácido propiônico (▤) e HMF (■). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.

Para a produção sustentável de etanol é necessário processar uma matéria-prima com um teor em açúcares superior a 100 g.L^{-1} (50 g.L^{-1} de etanol produzido; $\sim 6,5 \% \text{ v.v}^{-1}$) e por isso a escolha deverá recair sobre o processo extractivo com maior concentração de alga, apesar do nível de extracção ser inferior.

c) Influência do Número de Ciclos de Extracção de Açúcares da Biomassa

Quando se hidrolisou a biomassa, apenas se procedeu à separação física das 2 fases por centrifugação. No entanto, poderiam ter restado açúcares na biomassa resultantes da partição entre as 2 fases. Em ensaios com reduzidas concentrações de biomassa, a quantidade de açúcares retidos não será relevante, mas em ensaios com concentrações elevadas de biomassa, poderá haver retenção de uma quantidade apreciável de açúcares. Por isso, os resíduos provenientes dos ensaios com variação da concentração de biomassa foram sujeitos a cinco ciclos de extracção com água quente, para avaliar a quantidade de açúcar retida na biomassa. Os resultados encontram-se na Fig 3.19.

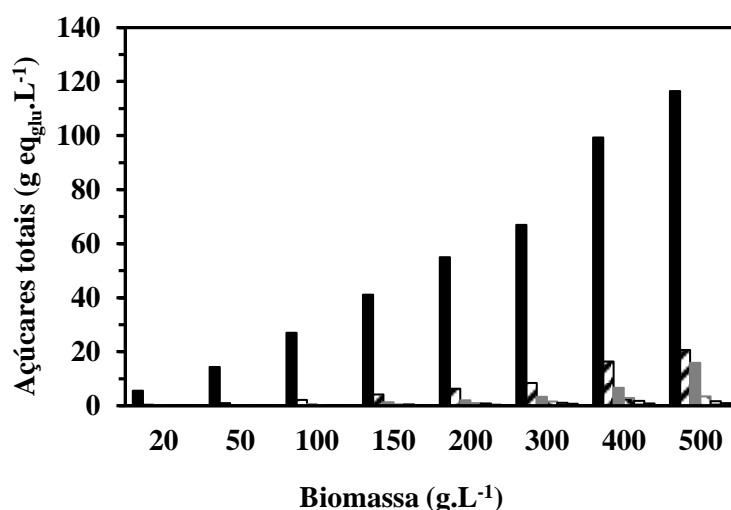


Figura 3.19 - Extracção de açúcares com água de biomassa tratada com ácido sulfúrico 2 N (Hidrólise ácida (■), 1ª (▨), 2ª (▩), 3ª (▧), 4ª (▦) e 5ª (▤) extracções). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.

A extracção com água a quente permitiu recuperar algum açúcar que restava na biomassa, embora em quantidades muito menores do que na extracção com ácido em que se promoveu o ataque da biomassa. O aumento da concentração de biomassa promoveu um aumento na retenção de açúcares devido ao aumento da área de fase sólida (Fig. 3.20; Quadro 3.5). No final, a quantidade extraída de todos os resíduos correspondeu ao valor obtido para a hidrólise ácida quantitativa ($31,8 \% (\text{g eq}_{\text{glu}}.\text{g bs}^{-1})$).

Quadro 3.5 – Eficiência do número de ciclos no processo de extracção de açúcares de biomassa seca de *Scenedesmus obliquus* com ácido sulfúrico 2N (Os resultados representam a média de ensaios independentes).

Biomassa (g.L ⁻¹)	Extracção ácida	Extracção global
	Açúcares totais (% (g eq _{glu} ·g bs ⁻¹))	Açúcares totais (% (g eq _{glu} ·g bs ⁻¹))
20	26,5	28,6
50	28,6	31,6
100	27,0	30,4
150	27,4	31,9
200	27,3	32,8
300	22,3	28,2
400	24,7	32,4
500	23,3	32,8

Tomando como exemplo a hidrólise realizada com 500 g.L⁻¹ de biomassa, no hidrolisado ácido obtiveram-se 116,5 g eq_{glu}.L⁻¹ em açúcares totais (0,58 g eq_{glu} em 5 mL). O sobrenadante da 1ª extracção deste resíduo continha um teor em açúcares totais de 20 g.L⁻¹, e o da 5ª continha menos de 1 g.L⁻¹. Se apenas o 1º extracto, que é o que comporta mais açúcar, fosse adicionado ao sobrenadante da hidrólise duplicar-se-ia o volume e a concentração final de açúcar passaria para 70 g.L⁻¹. Desta forma, haveria uma diluição significativa do hidrolisado, que não seria vantajosa para o processo de fermentação.

3.1.2.4 Remoção de Sulfato de Soluções Concentradas

A concentração de ácido sulfúrico que melhor permitiu extrair os açúcares da biomassa foi a 2 N (ou 1 M), a que corresponde a uma concentração de sulfato de 96 g.L⁻¹. Esta concentração excessiva de sulfato, dificulta o crescimento de leveduras, ainda que tradicionalmente se adicione sulfato ao seu meio de crescimento normal (sulfato de amónio – 5 g.L⁻¹; sulfato de magnésio heptahidratado – 1 g.L⁻¹). Torna-se assim necessário proceder à sua remoção antes da fermentação. A remoção deste ião de soluções por *overliming* consiste na precipitação do sulfato sob a forma de sulfato de cálcio ($K_{sp} = 6,1 \times 10^{-5}$) e é um processo que permite ainda remover alguns dos produtos tóxicos resultantes da degradação de açúcares, como o ácido acético e o HMF (Millati *et al.*, 2002; Mohagheghi *et al.*, 2006).

Neste estudo, e tal como esperado, observou-se que a eficiência da remoção de sulfato aumenta com o aumento da quantidade de hidróxido de cálcio adicionada (Quadro 3.6). A reacção é bastante rápida

(Quadro 3.7) mas após 30 min a concentração de sulfato residual era ainda muito elevada, apesar de se ter ultrapassado, em alguns casos, a quantidade estequiométrica (74 g.L^{-1}).

Quadro 3.6 - Eficiência da remoção de sulfato de soluções contendo ácido sulfúrico 2N com diferentes concentrações de hidróxido de cálcio (30min de reacção).

Hidróxido de cálcio (g.L^{-1})	Sulfato residual (g.L^{-1})	Eficiência remoção (%)
57	40,7	57,6
60	35,3	63,2
65	33,7	65,0
80	18,1	81,1
90	10,0	89,6

Quadro 3.7 - Eficiência da remoção de sulfato de soluções contendo ácido sulfúrico 2N por adição de 57 g.L^{-1} de hidróxido de cálcio

Tempo	Sulfato residual (g.L^{-1})	Eficiência remoção (%)
15 s	40,1	58,3
0,5 h	40,7	57,6
1 h	36,1	62,5
19 h	31,0	67,7
48 h	24,3	74,7

Também se estudou o efeito do pH inicial da solução ácida na eficiência da remoção de sulfato. Para tal, ajustou-se com hidróxido de sódio o pH a 2,46 e a 4,60, antes da adição de 57 g.L^{-1} de hidróxido de cálcio (Quadro 3.8). A neutralização da amostra com hidróxido de sódio afectou severamente a remoção de sulfato, possivelmente por ter dificultado a solubilização do hidróxido de cálcio necessário à reacção de precipitação, e pela formação de sulfato de sódio, um composto bastante solúvel.

Quadro 3.8 – Efeito do pH na eficiência da remoção de sulfato de soluções contendo ácido sulfúrico 2N por adição de 57 g.L^{-1} de hidróxido de cálcio ($t=48\text{h}$)

pH	Sulfato residual (g.L^{-1})	Eficiência remoção (%)
< 1	24,3	74,7
2,46	84,3	12,2
4,60	91,7	4,5

Ao contrário do habitual, a solubilidade do sulfato de cálcio diminui com o aumento da temperatura, e embora a adição de hidróxido de cálcio a uma solução ácida seja já uma reacção exotérmica, o procedimento de *overliming* descrito na literatura (Mohagheghi *et al.*, 2006) implica o aquecimento da solução ácida a 50 °C, antes da adição do hidróxido de cálcio. Foram por isso realizados dois ensaios com quantidades diferentes de hidróxido de cálcio (80 e 90 g.L⁻¹), e em que a solução inicial de ácido tinha sido previamente aquecida a 50 °C (Fig. 3.20).

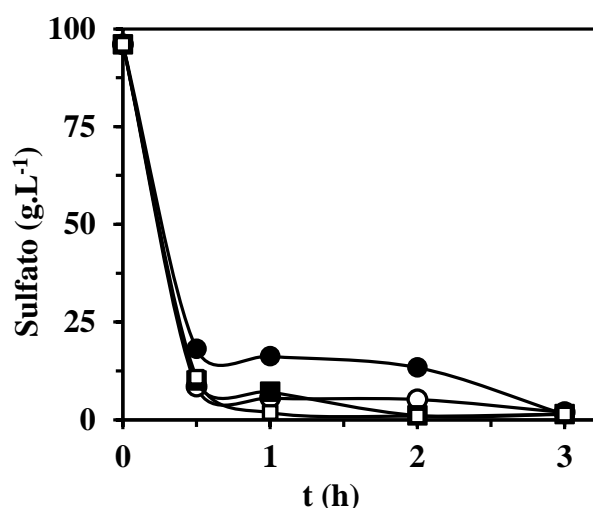


Figura 3.20 - Remoção de sulfato por adição de 80 g.L⁻¹ hidróxido de cálcio à temperatura ambiente (●) e a 50 °C (○) e de 90 g.L⁻¹ à temperatura ambiente (■) e a 50 °C (□).

Os resultados obtidos (Fig. 3.21) confirmaram o efeito descrito na literatura, pois a remoção de sulfato foi mais rápida à temperatura inicial de 50 °C do que à temperatura ambiente nos dois casos. Também neste estudo a remoção foi mais rápida com a adição de mais hidróxido de cálcio (90 g.L⁻¹): ao fim de uma hora, praticamente todo o sulfato tinha sido removido (concentração residual = 1,8 g.L⁻¹). Ao fim de 3 horas de ensaio, o sulfato já apresentava níveis residuais inferiores a 1 g.L⁻¹ nos quatro ensaios. Estes são níveis perfeitamente adequados a uma boa fermentação, pois o meio sintético tradicionalmente usado para produção de etanol contém 4 g.L⁻¹ de sulfato.

3.1.2.5 Selecção de Leveduras para a Fermentação Alcoólica de Açúcares

A análise por HPLC da composição em açúcares do hidrolisado de *Scenedesmus obliquus* indicou a presença de hexoses (glucose, galactose e/ou manose) e uma pentose (xilose), sendo a glucose o açúcar predominante. Dado que as pentoses não são, regra geral, fermentáveis pelas leveduras pertencentes ao género *Saccharomyces*, mais adequadas à produção industrial de etanol (Walfridsson

et al., 1996; Slininger *et al.*, 1985), tornou-se necessário testar várias leveduras para seleccionar as mais adequadas fermentação do hidrolisado de microalga.

a) Crescimento de Pré-inóculos

A inoculação de meios para fermentação alcoólica é feita usualmente com células em fase exponencial de crescimento, concentradas, a partir de pré-culturas. Durante a fase exponencial do crescimento de microrganismos, a taxa de duplicação é superior à taxa de morte e por isso a adaptação ao meio de fermentação é mais rápida.

De todas as leveduras, cujo crescimento foi caracterizado como descrito na secção 2.3.3.1, a *P. stipitis* foi a que apresentou um crescimento mais lento, apesar de ter alcançado no final o mesmo valor de densidade óptica que a maior parte das outras leveduras (Fig. 3.21). Já a *K. marxianus*, não só foi das que apresentou um crescimento mais rápido, como também foi a mais eficiente, atingindo uma concentração em biomassa mais elevada (Fig. 3.21; Quadro 3.9).

Quadro 3.9 – Taxa específica de crescimento e tempo de duplicação para as leveduras estudadas, em pré-culturas com 50 g.L⁻¹ de glucose (T=30 °C; 150rpm)

Microrganismo	μ (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)
<i>S. cerevisiae</i> DER24	0,530	1,31
<i>S. bayanus</i>	0,493	1,41
<i>S. cerevisiae I-uvarum</i> CCMI85	0,516	1,34
<i>S. carlsbergensis</i> ATCC-6269	0,533	1,34
<i>K. marxianus</i> YPCC-2671	0,528	1,31
<i>P. stipitis</i> CBS-181.F	0,466	1,63

No geral, a fase exponencial de crescimento dos microrganismos estudados situou-se entre as 3 e as 11 horas após a inoculação do meio de pré-cultura, à excepção da *P. stipitis*, cuja fase exponencial teve início às 7 horas e se prolongou até às 24 h após a inoculação.

Para a quantificação de biomassa produzida foram construídas rectas de calibração para a relação densidade óptica a 640nm vs. peso seco de cada uma das culturas (Fig. 3.22).

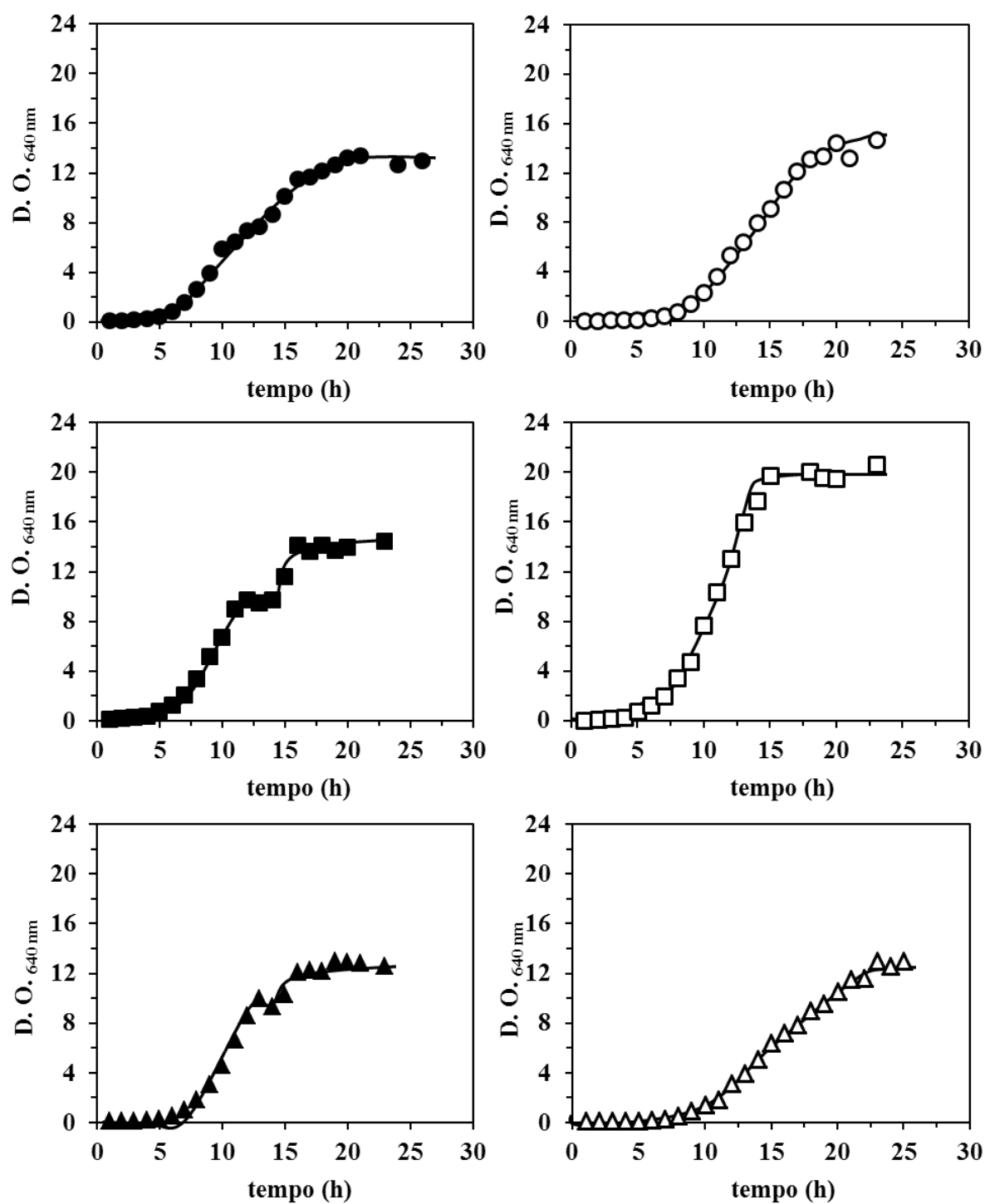
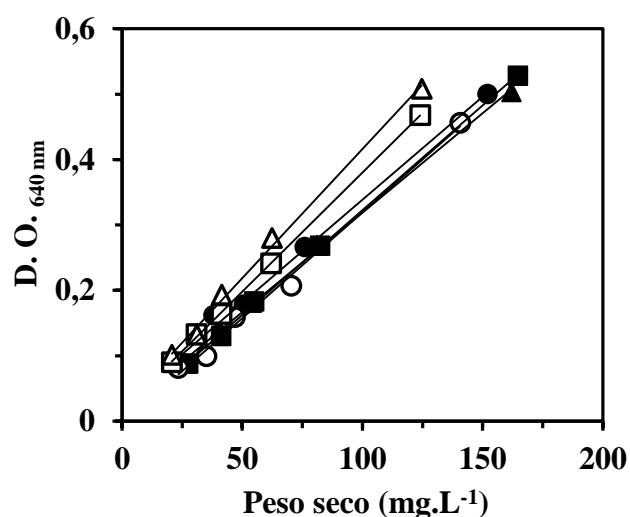


Figura 3.21 - Curvas de crescimento de pré-culturas de *S. cerevisiae* (●), *S. bayanus* (■), *S. uvarum* (▲), *S. carlsbergensis* (○), *K. marxianus* (□) e *P. stipitis* (△) em 50 g.L⁻¹ de glucose (T=30 °C; 150 rpm).



Microrganismo	Declive da recta	Ordenada na origem	R ²
<i>S. cerevisiae</i> DER24	0,0032	0,0233	0,9938
<i>S. bayanus</i>	0,0032	0,0020	0,9996
<i>S. cerevisiae I-uvarum</i> CCMI85	0,0030	0,0147	0,9984
<i>S. carlsbergensis</i> ATCC-6269	0,0032	- 0,0045	0,9932
<i>K. marxianus</i> YPCC-2671	0,0036	0,0160	0,9997
<i>P. stipitis</i> CBS-181.F	0,0039	0,0215	0,9962

Figura 3.22 - Relação entre a D. O. a 640 nm e o peso seco de culturas microbianas: *S. cerevisiae* (●), *S. bayanus* (■), *S. uvarum* (▲), *S. carlsbergensis* (○), *K. marxianus* (□) e *P. stipitis* (△) (50 g.L⁻¹ de glucose, T=30 °C; 150rpm).

As espécies pertencentes ao género *Saccharomyces* apresentaram uma relação entre densidade óptica a 640 nm e peso seco muito semelhante, tendo-se observado maior divergência com as leveduras *K. marxianus* e *P. stipitis*.

b) Fermentação Alcoólica em Meio Sintético

Sabendo que o hidrolisado de alga pode conter monossacáridos pouco fermentescíveis, como a xilose, realizaram-se crescimentos com as diferentes leveduras em meio sintético definido (sem qualquer presença de factores limitantes e com diferentes fontes de carbono (secção 2.3.3.2)), para avaliar qual o microrganismo mais adequado para a produção de etanol a partir de hidrolisados de alga.

Nos crescimentos em meio definido com 100 g.L⁻¹ de glucose, a levedura *P. stipitis* foi a que apresentou consumo mais elevado e maior produtividade em etanol - 96% do valor máximo teórico (0,51 g EtOH. g glu⁻¹ porque se produzem 2 mol de etanol por mol de glucose). As leveduras menos eficientes foram a *S. cerevisiae* e a *S. carlsbergensis*, com uma produtividade de 79% do valor máximo teórico. (Fig. 3.23; Quadro 3.10). Foram também realizados ensaios em meio sintético com 64 g.L⁻¹ de glucose e 36 g.L⁻¹ de xilose (Fig. 3.24).

Quadro 3.10 – Valores finais das fermentações em meio sintético com 100 g.L⁻¹ de açúcar.

Levedura	Fonte de carbono	Duração (h)	Peso seco _{max} (g.L ⁻¹)	Açúcar _{residual} (g eq _{glu} .L ⁻¹)	Etanol (g.L ⁻¹)	Y (g EtOH.g glu ⁻¹)
<i>S. cerevisiae</i>	Glucose	24	6,20	1,9	38,4	0,404
<i>S. bayanus</i>		24	5,97	1,7	40,9	0,430
<i>S. carlbergensis</i>		24	6,03	3,7	35,1	0,401
<i>S. uvarum</i>		24	5,76	1,7	40,0	0,453
<i>K. marxianus</i>		24	6,69	1,8	41,3	0,463
<i>P. stipitis</i>		84	4,10	0,9	44,3	0,491
<i>S. cerevisiae</i>	Glucose + Xilose (64:36)	24	4,74	31,7	25,2	0,418
<i>S. bayanus</i>		24	4,72	32,4	26,8	0,450
<i>S. uvarum</i>		24	4,13	30,5	25,3	0,377
<i>S. carlbergensis</i>		24	4,53	31,5	25,5	0,422
<i>K. marxianus</i>		24	4,44	28,8	25,2	0,400
<i>P. stipitis</i>		79	3,58	14,8	25,3	0,329

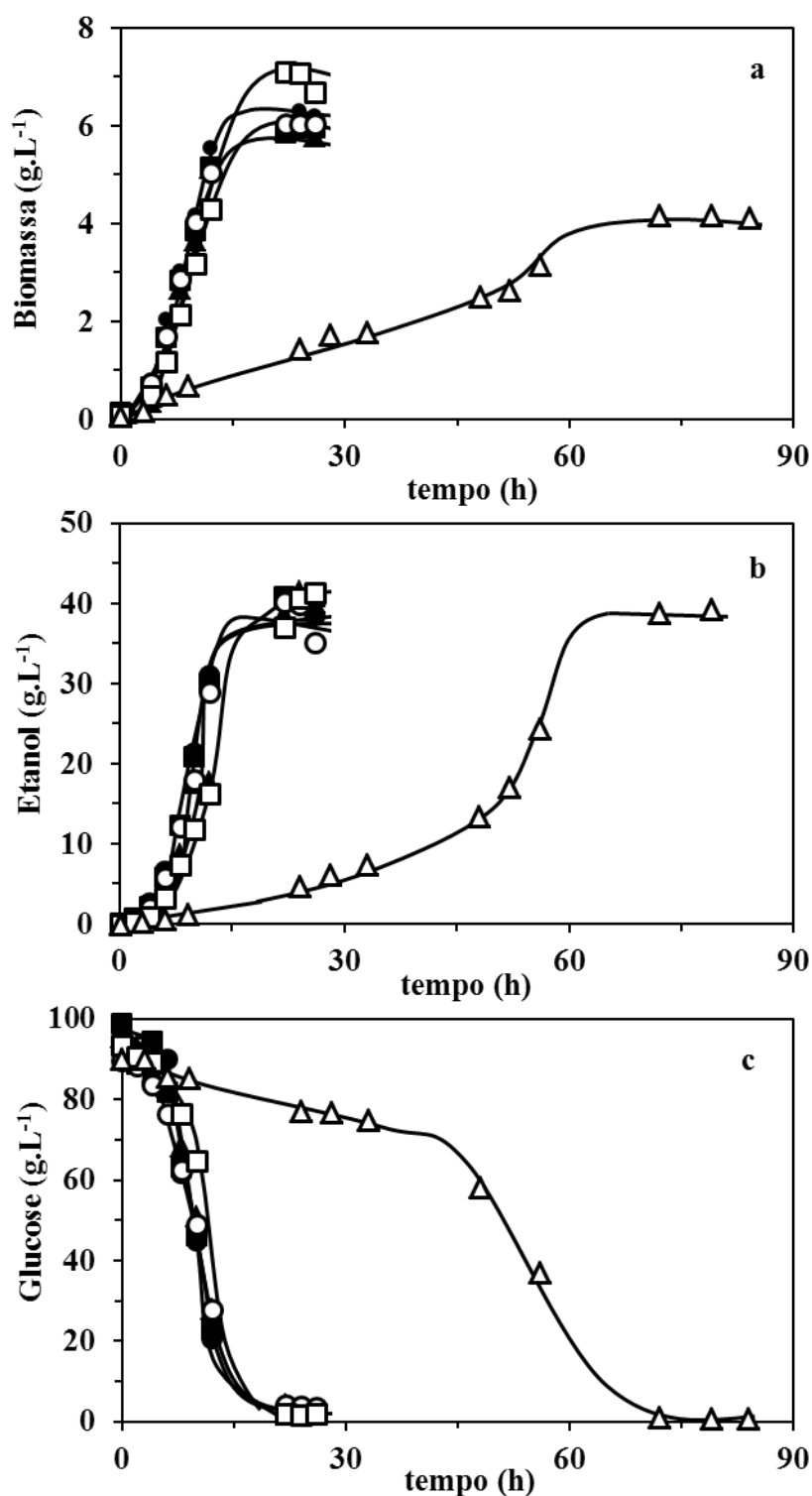


Figura 3.23 – Crescimento (a), produção de etanol (b) e consumo de glucose (c) em culturas microbianas de *S. cerevisiae* (●), *S. bayanus* (■), *S. uvarum* (▲), *S. carlsbergensis* (○), *K. marxianus* (□) e *P. stipitis* (△) em meio definido com 100 g.L⁻¹ de glucose (T=30°C; 150rpm).

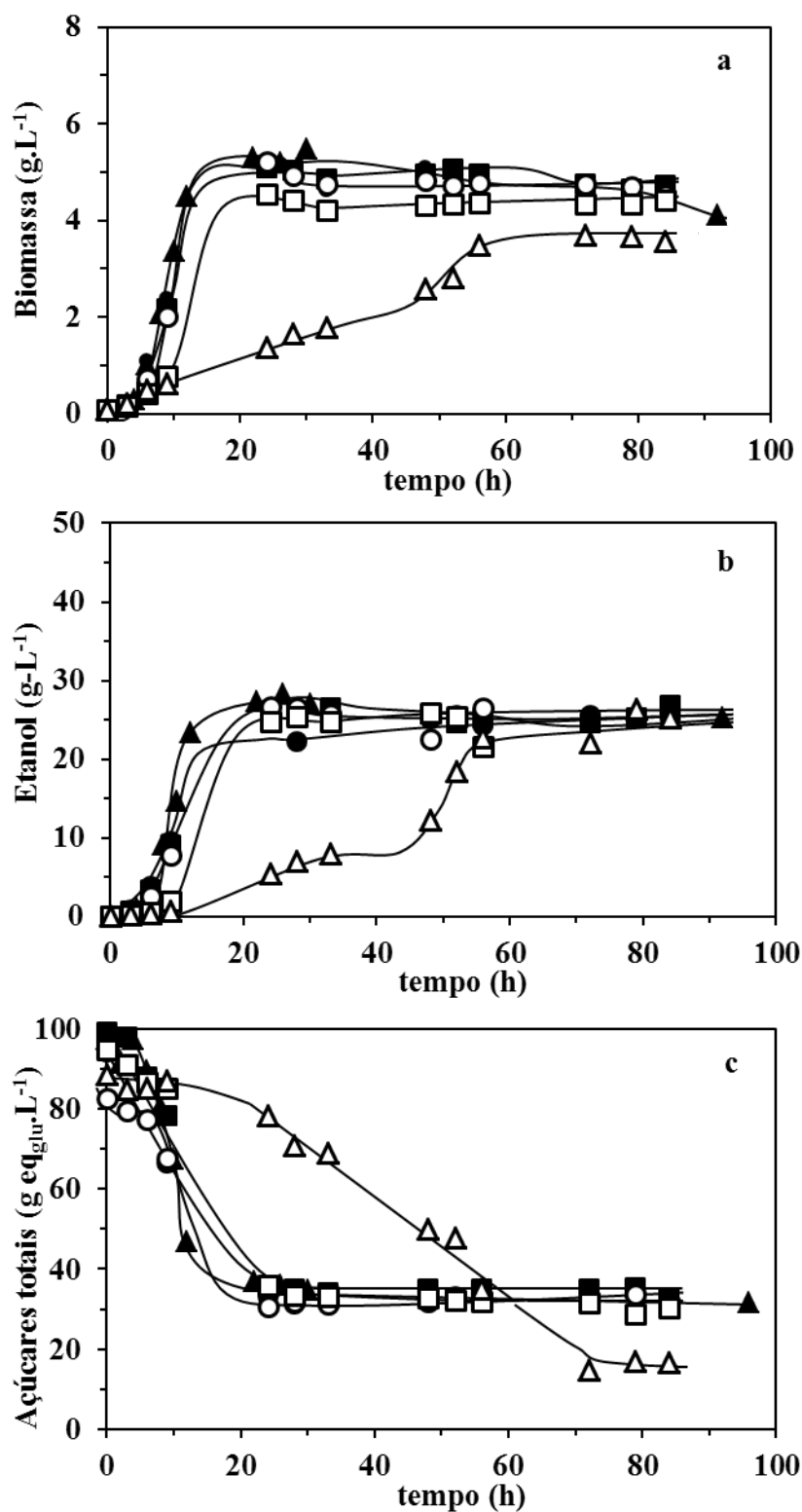


Figura 3.24 - Crescimento (a), produção de etanol (b) e consumo de açúcares (c) em culturas microbianas de *S. cerevisiae* (●), *S. bayanus* (■), *S. uvarum* (▲), *S. carlsbergensis* (○), *K. marxianus* (□) e *P. stipitis* (△) em meio definido com 64 g.L⁻¹ de glucose e 36 g.L⁻¹ de xilose (T=30°C; 150rpm).

Em meio definido contendo glucose e xilose, as leveduras que apresentaram maiores produtividades foram a *S. bayanus* (88% do valor máximo teórico), a *S. carlsbergensis* e a *S. cerevisiae* (Fig. 3.24; Quadro 3.10). Estas últimas, atingiram níveis de produtividade de 82%. A levedura *P. stipitis*, tal como referido na literatura (Agbogbo *et al.*, 2006), mostrou ser a única levedura a conseguir metabolizar xilose, tendo consumido cerca de metade da concentração disponível. No entanto, a produção de etanol foi similar à observada para as restantes (25 g.L^{-1}), apresentando uma produtividade de apenas $0,329 \text{ g}_{\text{EtOH}} \cdot \text{g glu}^{-1}$ (64% do valor teórico).

De entre todas as leveduras estudadas, a *K. marxianus*, foi novamente aquela para a qual se observou maior produção de biomassa.

Com base neste estudo, as leveduras seleccionadas para os ensaios de fermentação de hidrolisados foram a *K. marxianus*, a *S. bayanus* e a *S. carlsbergensis*, pois apresentaram boas produtividades em ambos os tipos de meio. Embora a levedura *P. stipitis* tenha sido a única a metabolizar xilose e tenha tido a maior produtividade em meio apenas com glucose, as diferenças não foram significativas ao ponto de compensar o elevado tempo de fermentação. Será eventualmente necessário continuar a procurar uma levedura ou consórcio que fermente misturas de hexoses e pentoses eficientemente (Yoon *et al.*, 2003).

Os estudos de ruptura celular realizados implicam a presença de elevadas concentrações de sulfato nos hidrolisados a fermentar. Por esta razão realizou-se um ensaio complementar, de fermentação por *S. carlsbergensis*, com adição extra de 20 g.L^{-1} de sulfato.

Os resultados obtidos com suplementação do meio com sulfato de sódio, quando comparados com os obtidos no meio normal, mostram que elevadas concentrações de sulfato têm um efeito nocivo no processo fermentativo (Quadro 3.11). A concentração de sulfato no hidrolisado será então um factor a ter em conta pelo que, elevadas concentrações deste ião, indicam a necessidade de destoxificar o hidrolisado.

Quadro 3.11 – Valores de produção a diferentes intervalos de tempo de uma fermentação com *S. carlsbergensis* em meio sintético com 100 g.L^{-1} de glucose e 25 g.L^{-1} de sulfato (30°C , 150rpm)

Tempo (h)	Biomassa (g.L^{-1})	Glucose _{residual} (g.L^{-1})	Etanol (g.L^{-1})
27	0,51	79	4,0
72	0,73	56	13,0

3.2 Acompanhamento do Crescimento da Microalga *Scenedesmus obliquus*

Como já foi descrito por vários autores, a composição das microalgas varia com as condições de crescimento (temperatura, composição do meio, luminosidade *etc.*) (Converti *et al.*, 2009, Zhila *et al.*, 2005 KaiXian e Borowitzka 1993, Soeder e Hegental, 1988, Shelef e Soeder, 1978) .

Com o objectivo de determinar como se poderia obter uma maior quantidade de biomassa microalgal, com um teor máximo de açúcares, foi estudado o crescimento de *Scenedesmus obliquus* em dois fotobiorreactores de coluna de bolhas com diferentes condições de iluminação e nas condições descritas na secção 2.3.4. Em ambos os casos, os fotobiorreactores foram inoculados com cerca de 50 mg.L⁻¹ de biomassa proveniente de culturas crescidas em fotobiorreactores de 1L.

3.2.1 Fotobiorreator Interior com Iluminação Contínua

A biomassa de *S. obliquus* crescida no reactor com iluminação contínua, atingiu um peso seco máximo de 0,37 g.L⁻¹ ao 8º dia após a inoculação e após o qual se observou uma fase estacionária de 4 d (Fig. 3.25). A fase de morte da cultura teve início no 12º dia de ensaio e prolongou-se

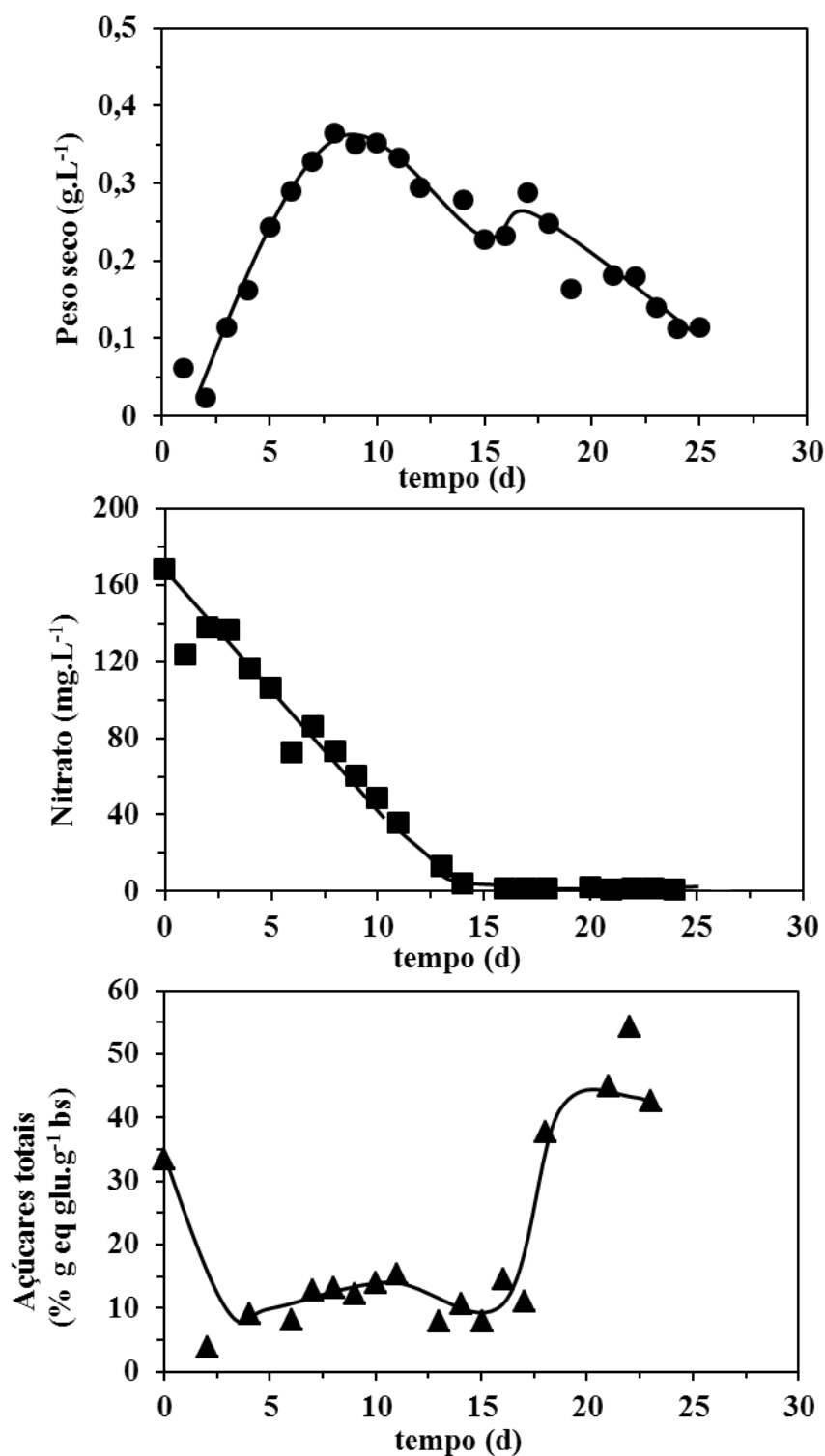


Figura 3.25 – Crescimento de *Scenedesmus obliquus* num reactor com iluminação contínua (produção de biomassa (●), consumo de nitrato (■) e variação do teor em açúcares totais da biomassa (▲)).

até ao 24 ° ($\text{biomassa}_{\min} = 0,11 \text{ g.L}^{-1}$). Durante esta fase a coloração verde da cultura tornou-se cada vez menos predominante e foi substituída por uma coloração progressivamente mais castanha-amarelada.

Ao longo da fase de crescimento observou-se a alcalinização da cultura até valores de pH de 10,6 (Fig. 3.26).

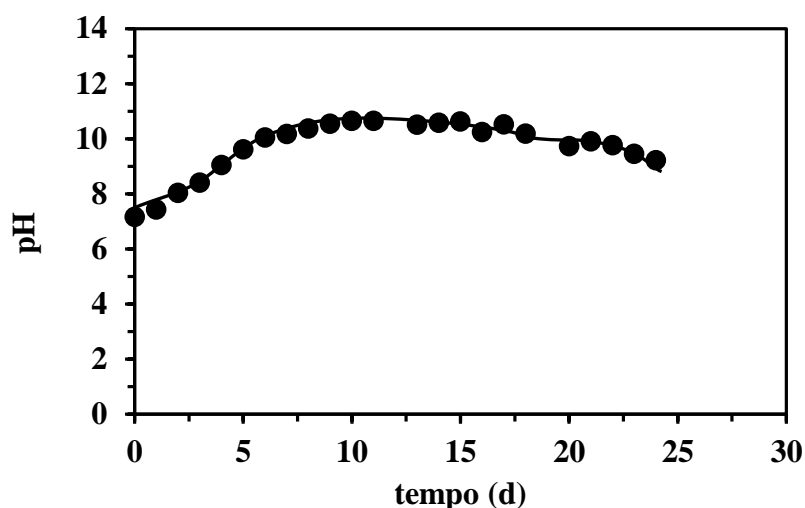


Figura 3.26 - Evolução do pH de uma cultura de *Scenedesmus obliquus* no reactor com iluminação contínua.

Em relação ao consumo de nutrientes, e como se pode ver na Fig. 3.27, à excepção do nitrato, não se observou depleção de nenhum dos outros nutrientes que compõem o meio Bristol, tendo-se registado consumo de fosfato, que cessou quando o nitrato se esgotou ($\text{fosfato}_{\text{residual}} = 49,4 \text{ mg.L}^{-1}$). Não se verificou qualquer consumo de sulfato ou cloreto.

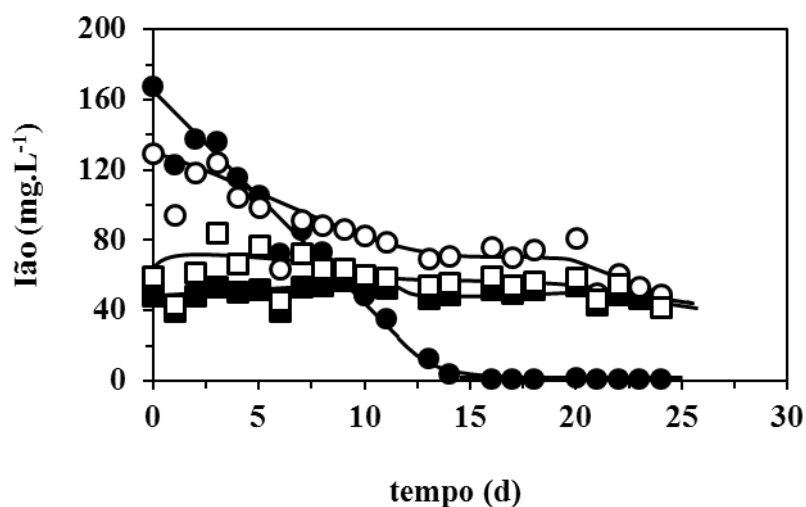


Figura 3.27 – Concentração de sais no meio de cultura de *Scenedesmus obliquus* crescida sob iluminação contínua: nitrato (●), fosfato (○), cloreto (■) e sulfato (□).

O teor inicial de açúcares, elevado (33 %) por sido utilizado como inóculo uma cultura em fase estacionária, diminuiu com o início da fase exponencial de crescimento (Fig. 3.25). Os açúcares terão sido utilizados para manutenção do metabolismo celular. Só a partir do 15º dia, quando a cultura já se encontrava em fase de morte, e sem azoto (nitrato) para assegurar funções vitais, é que se observou um aumento significativo no teor de açúcares da biomassa, tendo-se atingido um teor máximo de 45 % ($\text{g eq}_{\text{glu}} \cdot \text{g bs}^{-1}$) ao 23º dia.

3.2.2 Fotobiorreactor com Ciclo Dia/Noite

A cultura de *Scenedesmus obliquus* no reactor exterior apresentou duas fases exponenciais de crescimento. A primeira ocorreu entre o dia de inoculação e o 9º dia, atingindo um valor de peso seco máximo de $0,38 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e a segunda ocorreu entre o 13º e o 20º dia, tendo atingido um valor de peso seco máximo de $0,68 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Fig. 3.28).

Também neste caso se observou, ao longo da fase de crescimento da biomassa, a alcalinização do meio até valores de pH de 10,9 (Fig. 3.29). Quando a cultura entrou em fase de morte o valor de pH desceu progressivamente.

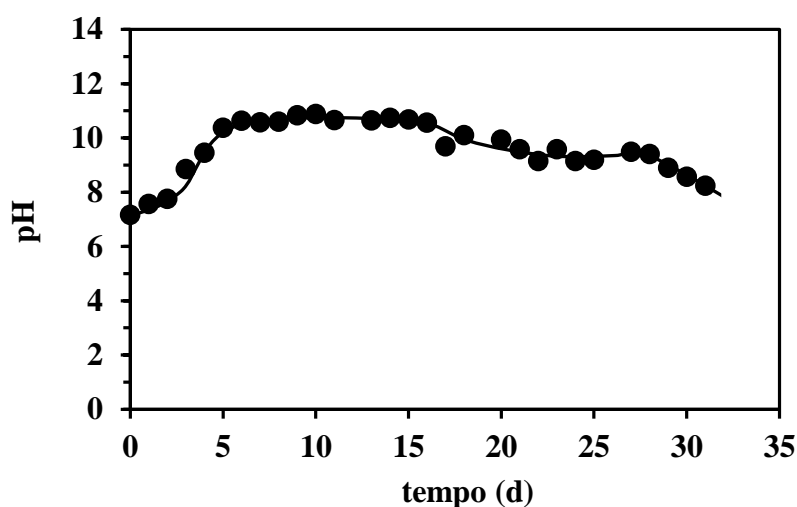


Figura 3.29 - Evolução do pH da cultura de *Scenedesmus obliquus* no fotobiorreactor exterior.

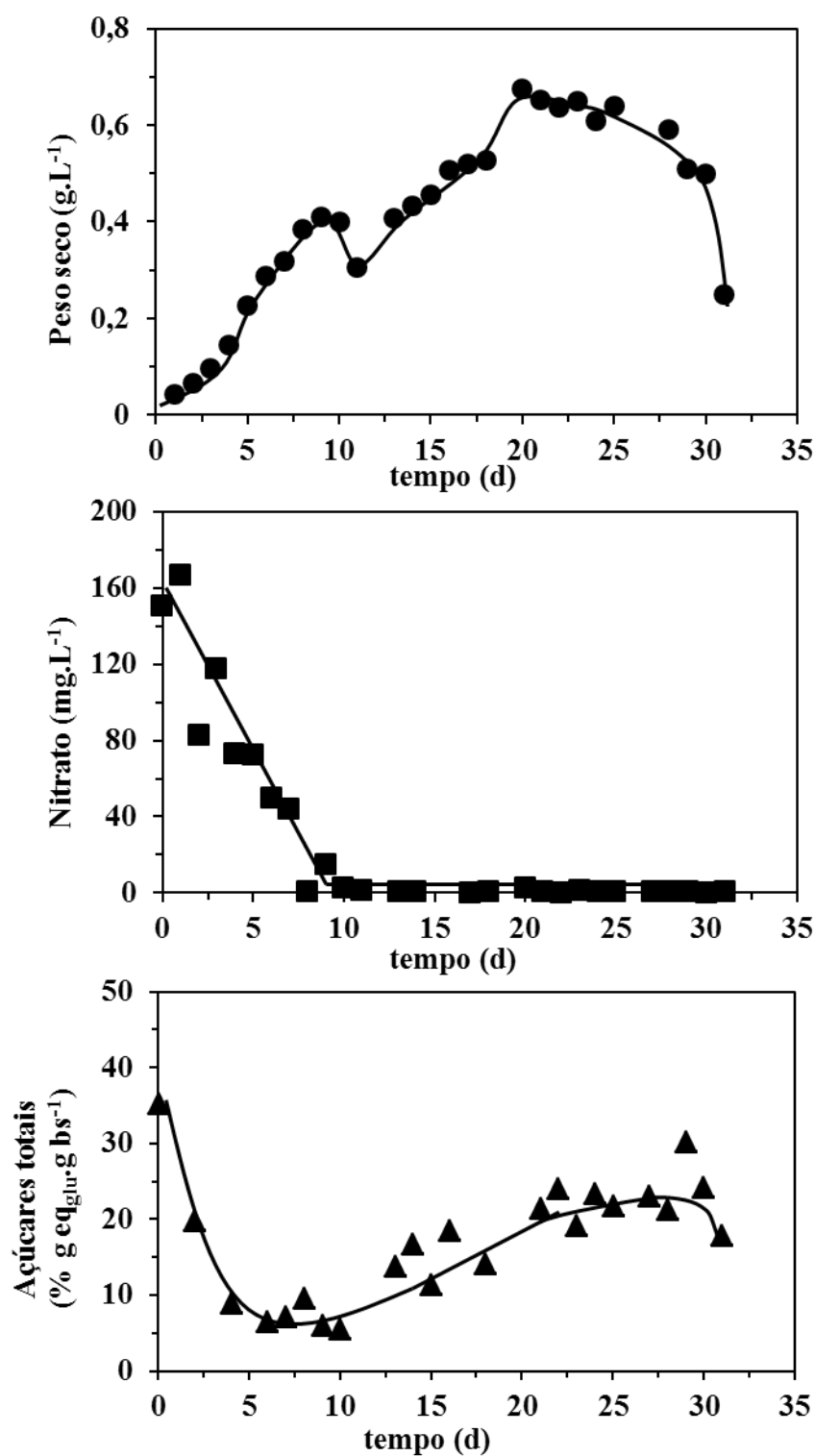


Figura 3.28 - Crescimento de *Scenedesmus obliquus* num reactor exterior com ciclo dia/noite (produção de biomassa (●), consumo de nitrato (■) e variação do teor em açúcares totais da biomassa (▲)).

Como se pode ver na Figura 3.29, a primeira fase exponencial no crescimento da microalga ocorreu em presença de nitrato no meio de cultura. Quando este foi totalmente consumido, teve início uma segunda fase de crescimento exponencial. O consumo de nitrato marcou também o início da acumulação de açúcares por parte da microalga, que atingiu o seu valor máximo com 24% (g eq_{glu}.g bs⁻¹).

O teor em iões cloreto e sulfato não variou significativamente, e o consumo de fosfato terminou quando ocorreu esgotamento do nitrato no meio (Fig. 3.30), tendo permanecido uma concentração residual de 62,5 mg.L⁻¹.

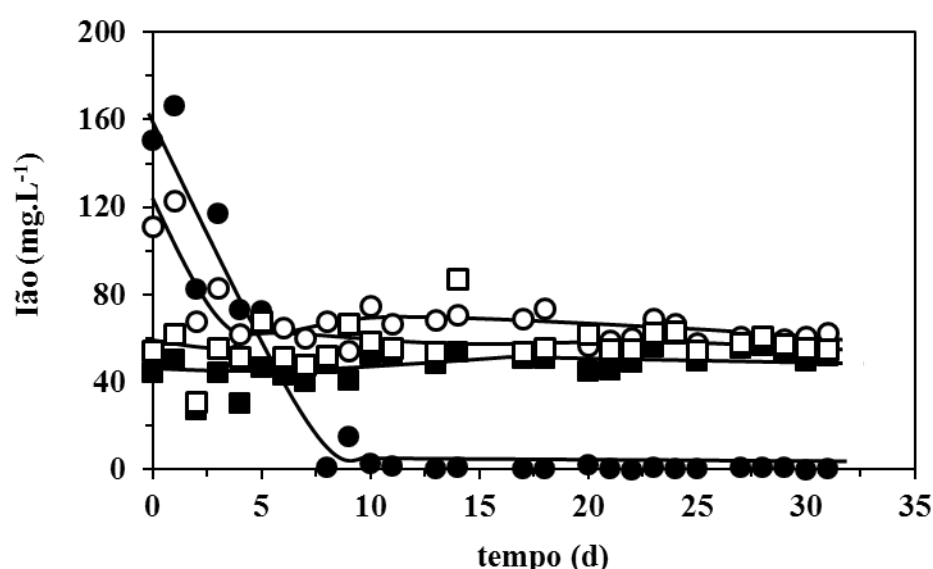


Figura 3.30 - Concentração de sais no meio de cultura de *Scenedesmus obliquus* crescida com ciclo dia/noite (nitrato (●), fosfato (○), cloreto (■) e sulfato (□)).

A evolução dos crescimentos da microalga *Scenedesmus obliquus* com iluminação artificial contínua e ciclo solar dia/noite, foi muito diferente em relação ao tempo de crescimento, quantidade de biomassa produzida e acumulação de açúcares (Figs. 3.27.e 3.29).

Em relação ao crescimento na cultura com iluminação contínua, apenas se observou uma fase exponencial entre o 1º e o 5º dias ($\mu = 0,489 \text{ h}^{-1}$) seguida de um período de latência curto, tendo entrado rapidamente em fase de morte mesmo antes do consumo total de nitrato. Já a cultura exterior cresceu exponencialmente entre o 1º e o 6º dias ($\mu = 0,407 \text{ h}^{-1}$) até à depleção de nitrato. Quando este se esgotou, teve início uma segunda fase de crescimento, mais lenta entre o 13º e o 20º dias ($\mu = 0,057 \text{ h}^{-1}$) mas que permitiu duplicar a quantidade de biomassa. A fase estacionária durou cerca de cinco dias, após a qual entrou em fase de morte.

Encontra-se já descrito por Bouterfas *et al.*, (2006) que o crescimento de microalgas em ciclo dia/noite permite maiores produções de biomassa, tal como observado neste estudo ($0,68 \text{ g.L}^{-1}$ em ciclo dia-noite *vs* $0,37 \text{ g.L}^{-1}$ sob iluminação contínua), pois é na fase escura que o ATP e NADPH (produzidos durante a fase fotossintética) são utilizados para o crescimento e metabolismo da microalga. Há ainda vários enzimas envolvidos na fixação de dióxido de carbono que estão inactivos durante a fase fotossintética, sendo também na fase escura que se forma o cofactor NADP necessário à fotossíntese. (Bouterfas *et al.*, 2006). É então possível que a iluminação contínua da cultura tenha induzido um estado de *stress*, pois a ausência de fase escura deverá ter reduzido a capacidade da célula obter carbono e energia, esta última sob a forma de ATP.

No ensaio com iluminação contínua o consumo de nitrato foi mais lento (10 d) do que no ensaio com ciclos dia/noite (Figs. 3.27 e 3.29), o que poderá eventualmente ser explicado pelo facto de as células, sob *stress*, terem dificuldade em sintetizar proteína. O consumo rápido de nitrato por esta microalga já foi observado noutros estudos (Elmaleh *et al.*, 1998; Krauss e Thomas, 1954), tendo sido descrita a sua assimilação, maioritariamente sob a forma de proteína. Em situações de carência deste nutriente pode mesmo ocorrer libertação de azoto para o meio, mas não na forma de nitrato, ficando este disponível para as restantes células, permitindo o seu crescimento. Este mecanismo adequa-se ao observado experimentalmente no reactor exterior, em que, após uma primeira fase estacionária em que se observou um rápido desaparecimento de nitrato do meio de cultura, houve uma breve fase estacionária a que se sucedeu uma segunda fase de crescimento exponencial na ausência de nitrato. Simultaneamente, com desaparecimento de nitrato do meio de cultura a microalga terá reduzido o seu metabolismo, realizando-se a síntese de açúcares sem utilização subsequente do carbono para a síntese de proteínas (Krauss e Thomas, 1954).

Nos resultados obtidos com o reactor com iluminação contínua (Fig. 3.25), é possível observar-se que entre o 14º e o 17º dia ocorre um pequeno aumento do peso seco da cultura, coincidente com o período em que o nitrato foi totalmente consumido. Este aumento, ainda que ligeiro, poderá ser também uma manifestação do mecanismo acima descrito, mas que, pelo seu estado de debilidade, as células não conseguiram manter.

Relativamente à acumulação de açúcares, esta foi superior no reactor com iluminação contínua (45 % *vs* 24 %). Contudo, devido à maior concentração de biomassa no reactor com ciclo dia/noite foi neste que se produziu mais açúcar (962 mg.L^{-1} *vs.* 90 mg.L^{-1}) durante períodos de tempo similares (aproximadamente 20 dias).

Em ambos os fotobiorreactores, ocorreu alcalinização da cultura até valores de pH próximos de 11 (Figs. 3.26 e 3.29). A alcalinização do meio de cultura ocorre em várias algas verdes, e está relacionado com a dissociação do dióxido de carbono na água e sua assimilação pelo microrganismo. Quando o dióxido de carbono atmosférico se solubiliza em água, origina bicarbonato, que se dissocia

em carbonato. O carbonato por sua vez é convertido a dióxido de carbono pela microalga durante a fase escura, ocorrendo a libertação de um ião hidróxido devido ao funcionamento da bomba de dióxido de carbono. As algas verdes são capazes de utilizar a energia fotossintética para forçar a bomba de dióxido de carbono a produzir mais iões hidróxido, o que facilita a solubilização e aumento da concentração deste gás no meio de cultura, tornando a fotossíntese mais eficiente (Shiraiwa *et al.*, 1993). Quando os microrganismos iniciam a fase de morte, a libertação de iões hidróxido diminui e o valor de pH desce, como resultado da dissolução do dióxido de carbono na água, como se observou nas culturas de *Scenedesmus obliquus* nos dois fotobiorreactores (Figs. 3.26 e 3.29).

3.3 Processo Global de Produção de Etanol a Partir da Microalga *Scenedesmus obliquus*

3.3.1 Produção da Biomassa

A biomassa para os ensaios fermentativos foi produzida numa lagoa fotossintética do tipo *raceway*, com 4,5 m³ de cultura, mas o seu crescimento foi, tal como esperado para um sistema deste tipo, mais lento que o observado nos fotobiorreactores, provavelmente devido ao tipo de agitação da cultura, menos turbulenta, que conduziu a que as células tivessem menor acesso à luz solar e ao dióxido de carbono atmosférico (Fig. 3.31).

Ao longo do crescimento da microalga não foi possível distinguir claramente a ocorrência das duas fases exponenciais devido à elevada pluviosidade que diluiu a cultura e cujo efeito se reflectiu em oscilações do peso seco da cultura (Fig. 3.31(1)). Tendo-se partido de um volume inicial de 4,5 m³, ao 15º dia o volume da cultura passou para 10 m³ devido à pluviosidade. Optou-se por não decantar a cultura porque isso implicaria a remoção de nutrientes do meio com consequente redução da produção de biomassa. Por evaporação, ao 30º dia o volume da lagoa tinha passado para 9 m³, contudo após novo período de pluviosidade intensa, ao 36º dia o volume da lagoa passou para 16m³. Como nesta altura, o nitrato já tinha sido consumido procedeu-se à decantação da cultura até um volume de 10 m³. Entre o 43 º dia e o 50 º, observou-se nova diluição da cultura devido à pluviosidade. A acumulação de açúcares não pareceu ter sido significativamente afectada e quando o teor estabilizou em cerca de 30% (53 º dia), procedeu-se à recolha da biomassa.

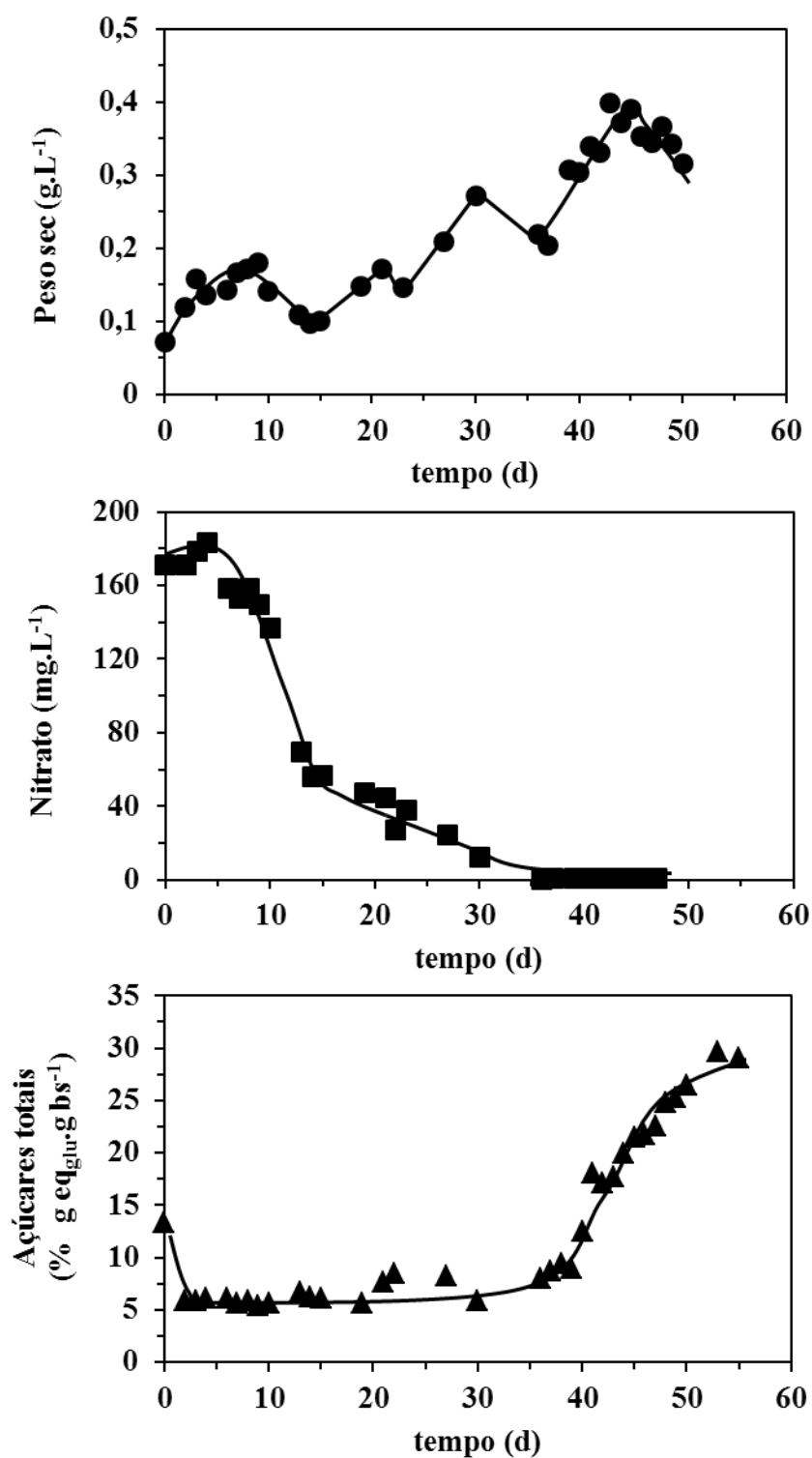


Figura 3.31 - Crescimento de *Scenedesmus obliquus* numa lagoa fotossintética (produção de biomassa (●), consumo de nitrato (■) e variação do teor em açúcares totais na biomassa (▲)).

Tal como esperado, e à semelhança do que foi observado nos ensaios em fotobiorreactor, também na lagoa se verificou alcalinização do meio de cultura (Fig. 3.32), até valores de pH de cerca de 10,8, assim como o esgotamento do nitrato em paralelo com consumo de fosfato ($\text{fosfato}_{\text{residual}} = 15,56 \text{ mg.L}^{-1}$) (Fig. 3.33). Embora pareça existir um decréscimo nas concentrações de cloreto e sulfato, tal deverá ter sido apenas resultante da diluição provocada pela pluviosidade.

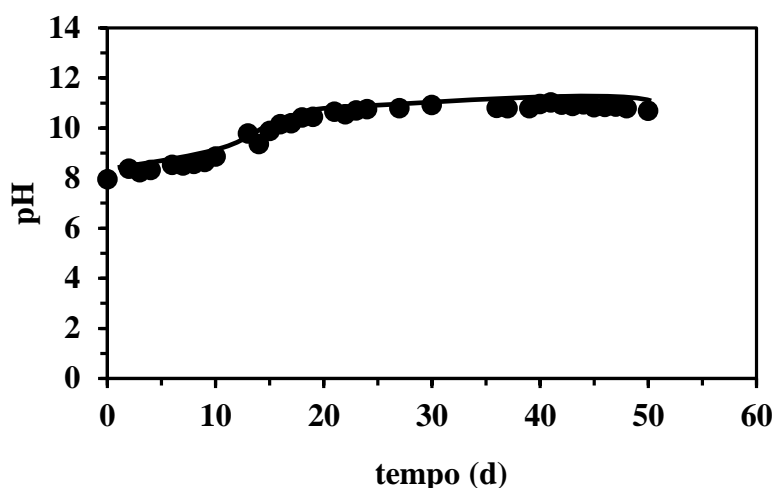


Figura 3.32 - Evolução do pH da cultura de *Scenedesmus obliquus* numa lagoa fotossintética do tipo *raceway*.

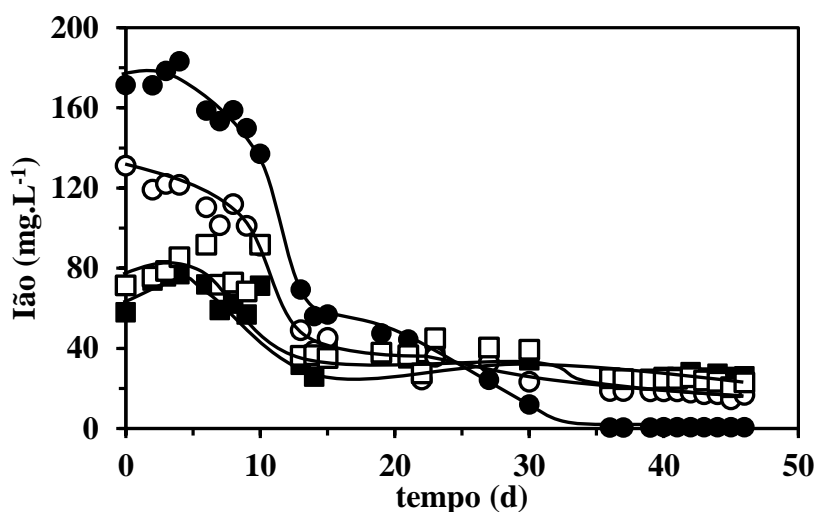


Figura 3.33 - Concentração de sais no meio de cultura de *Scenedesmus obliquus* cultivada numa lagoa fotossintética: nitrato (●), fosfato (○), cloreto (■) e sulfato (□).

Novamente, a acumulação de açúcares pela microalga só se verificou quando o nitrato foi totalmente consumido e o valor atingido ao fim de 53 d foi de 30% de açúcares, em peso de biomassa seca. Ao

longo do crescimento da biomassa, o teor em glucose manteve-se próximo de 50%, relativamente ao teor global de açúcares determinado por HPLC, tendo-se observado ligeiras reduções nos dias em que a pluviosidade provocava diluição da cultura (Fig. 3.34). A partir do 36º dia, quando deixou de haver nitrato no meio de cultura, observou-se um aumento da percentagem relativa de glucose simultaneamente com o aumento do teor em açúcares, o que poderá indicar a síntese de polímeros ricos neste monómero, como por exemplo amido, como resposta à escassez de nutrientes.

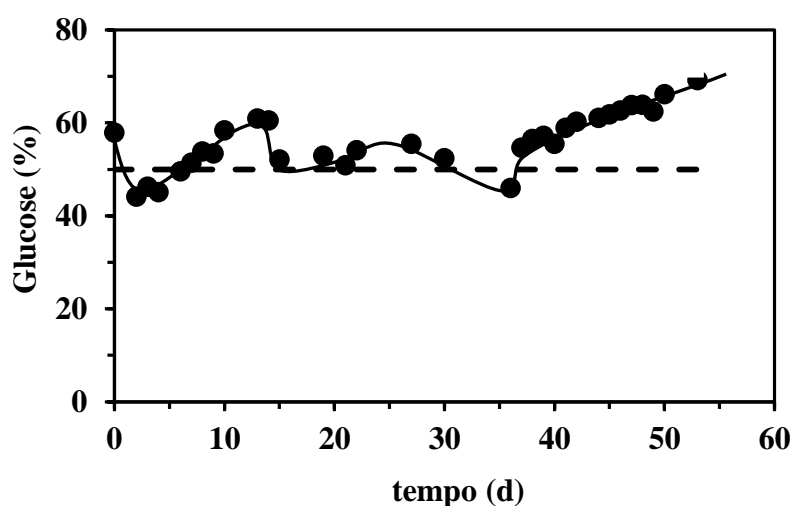


Figura 3.34 - Variação do teor em glucose no total de açúcares extraídos ao longo do ciclo de vida da microalga *Scenedesmus obliquus* cultivada numa lagoa fotossintética. A linha a tracejado representa os 50 % de glucose.

Ao fim de 53 d, a biomassa foi colhida por decantações sucessivas seguidas de centrifugação, tendo-se obtido aproximadamente 16 kg de biomassa húmida. Depois de seca a 80 °C até peso constante, obtiveram-se 4,7 kg de biomassa seca de *Scenedesmus obliquus* (Fig. 3.35).



Figura 3.35 – Diferentes fases do cultivo e secagem de *Scenedesmus obliquus*: a) crescimento em lagoa fotossintética, b) e c) microalga centrifugada, d) biomassa antes da secagem, e) biomassa após a secagem.

3.3.2 Extração dos Açúcares

Para extracção dos açúcares foram processados no total 4,5 kg de biomassa seca usando 9 L de ácido sulfúrico 2 N, tal como descrito na secção 2.3.5.2. A separação do hidrolisado foi realizada num peneiro mas ocorreu uma elevada retenção de hidrolisado pela biomassa (50%) tendo-se recuperado somente 1,5 L deste, por cada hidrólise realizada com 1,5 kg de biomassa seca (Fig. 3.36).

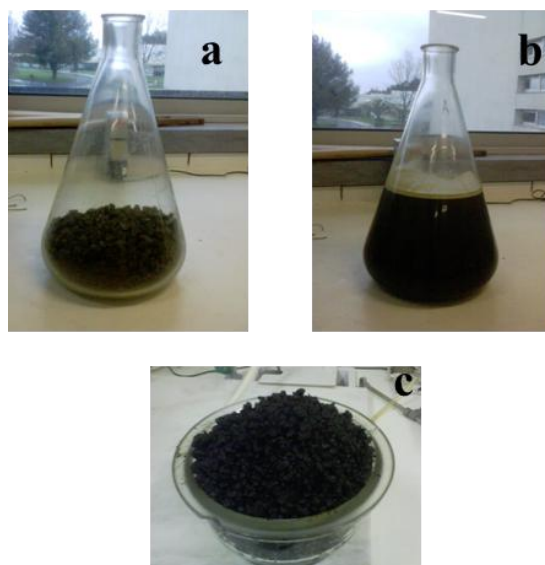


Figura 3.36- Fases da extracção de açúcares de biomassa de *Scenedesmus obliquus* cultivada numa lagoa fotossintética: biomassa antes da adição de ácido (a), hidrolisado da biomassa antes da sua remoção (b), resíduo das hidrólises ácidas (c).

3.3.3 Destoxificação do Hidrolisado

O hidrolisado final, após remoção da biomassa residual, apresentava um valor de pH inferior a 1 e concentração final de sulfato de 114 g.L^{-1} pelo que foi necessário proceder à sua destoxificação para criar condições adequadas à fermentação já que um ensaio prévio indicou que a presença de elevadas concentrações de sulfato é nociva para o processo fermentativo (Quadro 3.11).

O primeiro passo consistiu na remoção do sulfato pela adição de hidróxido de cálcio. Este processo não só permitiu remover o sulfato por precipitação na forma de sulfato de cálcio, mas também neutralizar o ácido por reacção com o hidróxido. Embora se tenha verificado na secção 3.1.2.4 que o aquecimento a 50°C facilita a precipitação do sulfato de cálcio, optou-se por realizar a destoxificação à temperatura ambiente, evitando assim uma eventual degradação dos açúcares por acção do calor, tal como já foi descrito por Millati,*et al.*, (2002).

Foi adicionada quantidade estequiométrica de hidróxido de cálcio para remoção total de sulfato (88 g.L^{-1}). Contudo, após 0,5 h de reacção apenas se tinha conseguido remover 68 % do ião, tendo permanecido em solução uma concentração residual de 36 g.L^{-1} (Quadro 3.12).

Quadro 3.12 – Variação do teor iões ao longo do processo de *overliming* do hidrolisado de microalga (n.a. – não avaliado; n.d.- não detectado).

	Tempo (h)	pH	Sulfato (g.L ⁻¹)	Cloreto (g.L ⁻¹)	Nitrato (g.L ⁻¹)	Fosfato (g.L ⁻¹)
Hidrolisado	0	<1	114,5	3,9	2,4	36,7
Hidrolisado + Ca(OH) ₂ (88g.L ⁻¹)	0,5	n.a.	36,1	0,9	0,7	27,2
Hidrolisado + Ca(OH) ₂ (107g.L ⁻¹)	72 h	9,8	7,0	0,4	n.d.	n.d.

Foi então adicionado mais hidróxido de cálcio, perfazendo uma concentração final de 107 g.L⁻¹. Após 2 dias, sob agitação constante, atingiu-se um nível de remoção de 94 % (concentração final = 7,0 g.L⁻¹; pH = 9,8). Na análise por cromatografia iónica verificou-se ter ocorrido, simultaneamente, remoção total de nitrato e fosfato e redução da concentração de ião cloreto em 91 %. Este resultado indica que terá havido precipitação de outros iões com a adição do hidróxido de cálcio, o que poderá justificar a necessidade de adicionar bastante mais do que a quantidade estequiométrica para remoção do sulfato.

Dado que as leveduras têm alguma tolerância a sulfato, pois o meio de cultura sintético tem uma concentração de 4,04 g.L⁻¹ de sulfato (Quadro 2.3), decidiu-se não adicionar mais hidróxido de cálcio, considerando que uma concentração final de sulfato de 7 g.L⁻¹ no hidrolisado não constituiria um factor de grande *stress* para o crescimento destes microrganismos.

O hidrolisado foi então centrifugado para remoção do precipitado. Seguidamente, e dado que o valor de pH ótimo para a acção fermentativa das leveduras se situa entre 4 e 5, foi necessário ajustar o pH do meio. Utilizou-se para tal ácido orto-fosfórico, pois dos ácidos inorgânicos disponíveis seria aquele que se pensava ter menos efeito nocivo, já que as leveduras necessitam de fosfato para incorporar na molécula de ATP.

A adição de ácido fosfórico foi feita juntando 1 mL de cada vez até um total de 7 mL para se obter um valor de pH de 5,2. No entanto, a certa altura do processo (pH=6), pareceu estabelecer-se no hidrolisado um efeito tampão que foi ultrapassado com a adição de 0,5 mL.L⁻¹ de ácido nítrico. Foi adicionado apenas o volume mínimo necessário de ácido nítrico, já que as leveduras, apesar de necessitarem de azoto para o seu metabolismo, não conseguem consumir nitrato (Choudary e Ramananda 1984). Para evitar também uma acumulação excessiva de fosfato no hidrolisado a fermentar, optou-se por considerar 5,2 como o valor de pH final.

3.3.4 Fermentação do Hidrolisado

As três leveduras seleccionadas para a fermentação do hidrolisado da microalga foram a *K. marxianus*, *S. bayanus* e *S. carlsbergensis*. O hidrolisado foi inoculado directamente, sem qualquer suplementação, pois este é já um meio de cultura complexo contendo proteínas, sais e muitos outros componentes da microalga *Scenedesmus obliquus*, que foram considerados suficientes para permitir o decorrer da fermentação. Apenas se procedeu à inoculação inicial de uma quantidade maior (300 mg.L^{-1}) de levedura recolhida em fase exponencial de crescimento em meio sintético com glucose, do que a usada nos testes de selecção de microrganismos, para garantir a presença de uma quantidade adequada de indivíduos viáveis.

Não foi observada fase de latência nas fermentações realizadas com os três microrganismos, o que indicou que, tal como esperado, a suplementação do hidrolisado não era necessária, e o processo encontrava-se praticamente terminado ao fim de 24 h, embora sem consumo total de açúcares (Fig. 3.37; Quadro 3.13).

Quadro 3.13 – Valores finais para as fermentações de hidrolisado de *Scenedesmus obliquus* ($T=30^{\circ}\text{C}$; 150rpm).

Levedura	Biomassa seca máx (g.L^{-1})	Açúcares residuais ($\text{g eq}_{\text{glu}}.\text{L}^{-1}$)	Etanol (g.L^{-1})	Y (g EtOH.g glu^{-1})
<i>K. marxianus</i>	4,37	39,0	11,7	0,485
<i>S. carlbergensis</i>	5,26	39,3	11,2	0,466
<i>S. bayanus</i>	4,98	40,5	9,0	0,399

A concentração inicial em açúcares do hidrolisado era de $63,2 \text{ g eq}_{\text{glu}}.\text{L}^{-1}$, bastante mais reduzida do que o esperado a partir da análise realizada no final da fase de desenvolvimento da biomassa microalgal (30% em peso de biomassa seca originaria uma concentração em açúcares totais de 150 g.L^{-1}) (Figs. 3.31 e 3.37). A redução observada poderá ter resultado de *stress* sofrido pelas células durante o processo de recolha e concentração, que não foi muito eficiente por ter levado demasiado tempo, ou ainda porque a biomassa seca ainda se encontrava em aglomerados que a solução de ácido sulfúrico não conseguiu atacar eficientemente.

A composição deste hidrolisado, detectada em HPLC, indicou a presença de glucose ($23,3 \text{ g.L}^{-1}$), galactose ($5,3 \text{ g.L}^{-1}$), manose ($8,0 \text{ g.L}^{-1}$), arabinose ($2,1 \text{ g.L}^{-1}$) e xilose ($3,0 \text{ g.L}^{-1}$) (Fig. 3.38), num teor global de $41,6 \text{ g.L}^{-1}$, valor substancialmente inferior ao obtido com análise colorimétrica. Nesta fase do trabalho foi já possível a separação efectiva destes açúcares, devido à utilização de um outro aparelho e à compra de uma nova coluna mais eficaz na separação de açúcares: Aminex HPX-87P, mas que não permite a avaliação de produtos de degradação de açúcares.

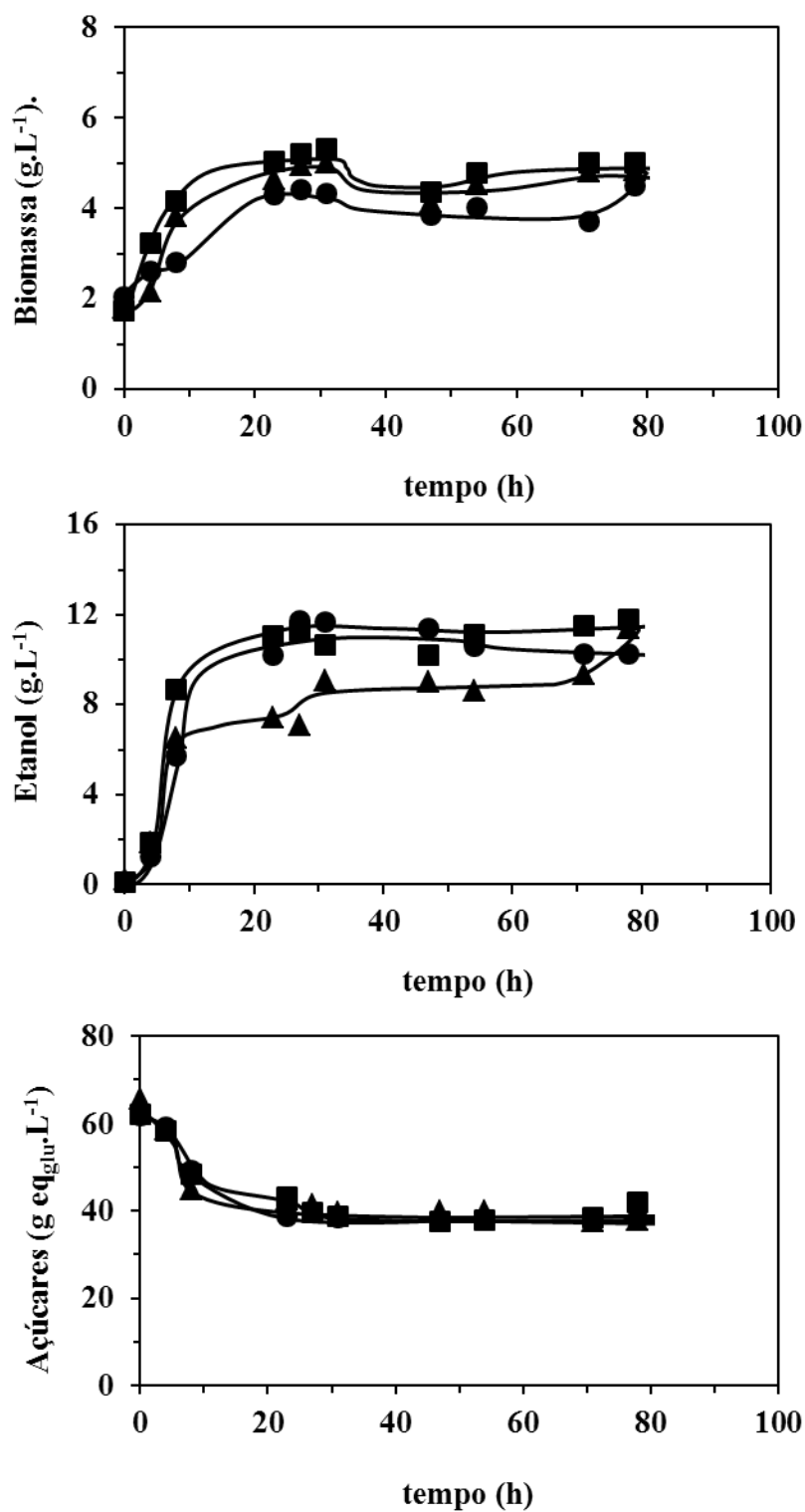


Figura 3.37 - Crescimento (a), produção de etanol (b) e consumo de açúcares totais (c) em culturas de *S. bayanus* (▲), *S. carlsbergensis* (■) e *K. marxianus* (●) em hidrolisado de microalga (T=30°C; 150rpm).

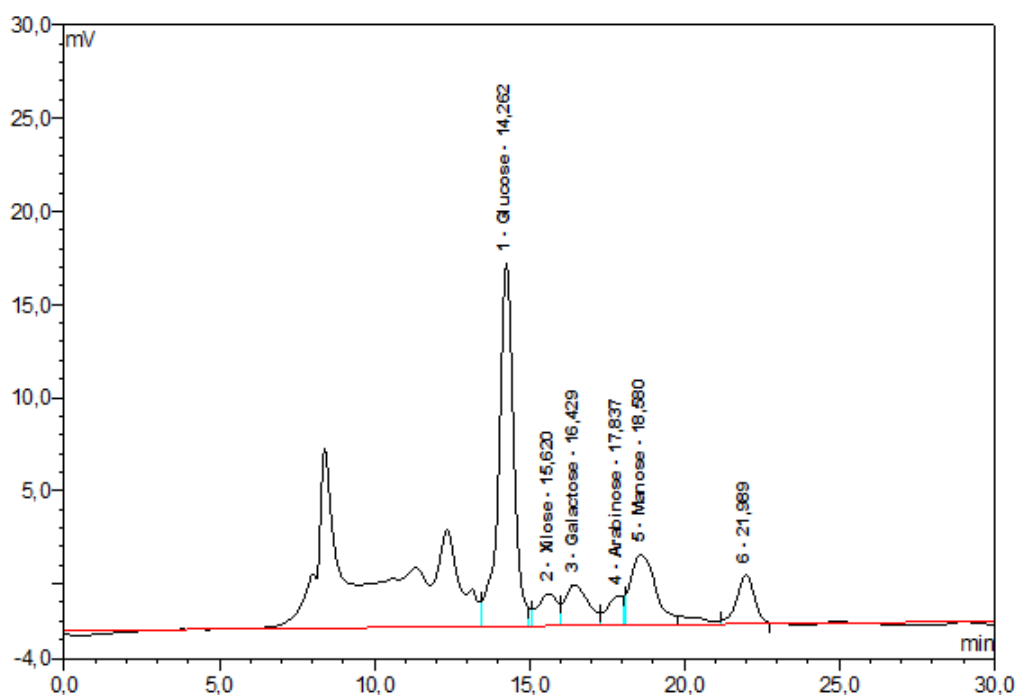


Figura 3.38 - Cromatograma de HPLC da análise de uma amostra de hidrolisado em ácido 2 N de *Scenedesmus obliquus* numa coluna Aminex 87P.

Com excepção da xilose, todos os outros açúcares detectados são referidos por outros autores (Yoon *et al.*, 2003) como facilmente metabolizáveis por leveduras do tipo *Saccharomyces cerevisiae*, como é o caso das *S. bayanus* e *S. carlsbergensis* e, na realidade, foi quase isso que se observou (Quadro 3.14): a glucose e a manose foram completamente fermentadas por qualquer uma das 3 leveduras que, no entanto, não metabolizaram xilose ou arabinose, pois são pentoses. As leveduras *S. carlsbergensis* e *K. marxianus*, ao contrário da *S. bayanus* parecem possuir também a capacidade de usar galactose embora só tenham consumido cerca de metade da concentração disponível.

Quadro 3.14 - Concentração de açúcares determinada por HPLC, após fermentação, no hidrolisado de *Scenedesmus obliquus* durante as fermentações (T=30°C; 150rpm) (n.d.- não detectado).

Levedura	Tempo (h)	Glucose (g.L ⁻¹)	Galactose (g.L ⁻¹)	Manose (g.L ⁻¹)	Arabinose (g.L ⁻¹)	Xilose (g.L ⁻¹)
<i>K. marxianus</i>	31	n.d	2,44	0,97	1,88	2,37
	78	n.d.	2,44	1,12	1,95	2,44
<i>S. carlsbergensis</i>	31	0,04	2,59	0,32	2,06	1,13
	78	0,99	2,08	0,67	1,58	2,19
<i>S. bayanus</i>	31	1,24	5,07	0,77	1,84	3,12
	78	1,18	3,78	0,89	1,95	2,70

O processo de fermentação alcoólica do hidrolisado não foi, portanto, muito eficiente na conversão dos açúcares em etanol (Quadro 3.13) tendo-se obtido concentrações muito baixas de produto ($9,0 - 11,7 \text{ g.L}^{-1}$) provavelmente devido à presença de eventuais produtos tóxicos da degradação de açúcares formados durante o processamento. Como se pode ver no Quadro 3.14, o rendimento máximo foi atingido com a levedura *K. marxianus*, que já se tinha revelado anteriormente como uma das melhores entre as testadas.

4 CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO

A produção de biocombustíveis a partir de microalgas tem sido estudada como alternativa às matérias-primas convencionais. Embora a investigação nos últimos anos se tenha centrado principalmente sobre a produção de biodiesel a partir dos óleos acumulados nas células de microalga, estes microrganismos têm outras potencialidades neste campo. Este trabalho teve como objectivo demonstrar a possibilidade de produção de bioetanol a partir da microalga *Scenedesmus obliquus*, optimizando e realizando todo o processo desde a produção da biomassa à fermentação por leveduras, passando pela extracção de açúcares.

O crescimento da microalga em fotobiorreactores, sob diferentes condições de iluminação, mostrou que a produção de biomassa é mais eficiente com um ciclo dia/noite, tendo-se atingindo concentrações de 0,68 g.L⁻¹ em biomassa no fotobioreactor de coluna de bolhas e 0,40 g.L⁻¹ na lagoa fotossintética. Foi observada uma relação directa entre o desaparecimento de nitrato e a acumulação de açúcares pela biomassa, embora a carência deste nutriente não se tenha revelado prejudicial para o desenvolvimento da cultura. Tal poder-se-à dever à capacidade de mobilização de azoto, armazenado na forma de proteína, para o crescimento celular e acumulação de açúcares. Foi também observado nesta fase que a proporção de glucose aumentou em relação aos outros monossacáridos, o que poderá indicar síntese de amido ou outro polímero similar.

Esta microalga tem sido descrita como possuindo um teor de açúcares entre 10 e 17 % (m.m⁻¹). Contudo, ao longo deste trabalho, e com boas produtividades em biomassa, extraíram-se açúcares na ordem de 30 % (m.m⁻¹). Foi detectada nos extractos de alga a presença de galactose, xilose, arabinose, manose e glucose, sendo esta última o composto dominante cuja concentração corresponde a cerca de 60-65 % do total. Do ponto de vista da composição em açúcares, e sendo as hexoses, e em particular a glucose, os açúcares preferenciais para as leveduras pertencentes ao género *Saccharomyces* que são as mais utilizadas em fermentação industrial, esta microalga parece ser adequada para ser usada como matéria-prima para a produção de bioetanol.

De entre os vários tratamentos estudados, o mais eficaz para extracção dos açúcares da biomassa de *Scenedesmus obliquus* foi a hidrólise com ácido sulfúrico 2 N, em autoclave a 120 °C, durante 30 min. Os métodos físicos, menos agressivos, revelaram-se ineficientes face à constituição da parede celular desta microalga, que inclui esporopolenina, um composto com elevada resistência à ruptura. A secagem prévia da biomassa também teve um papel determinante na eficiência da hidrólise ácida, tendo aumentado a extracção da hidrólise ácida em 55 % devido ao enfraquecimento das fibras de celulose e hemicelulose e da esporopolenina da parede celular.

A quantidade de biomassa microalgal a utilizar no processo de extracção também se revelou um parâmetro crítico para que se obtenham hidrolisados com uma concentração em açúcares ($> 100 \text{ g.L}^{-1}$) que permita a produção sustentável de bioetanol.

Realizou-se um ensaio de produção de biomassa de *Scenedesmus obliquus* à escala piloto ($4,5 \text{ m}^3$) em que, após 53 d, se recolheu 4,7 kg de biomassa que foi posteriormente hidrolisada com ácido sulfúrico. O hidrolisado foi destoxificado, por *overliming*, e inoculado com leveduras fermentativas que produziram $9,0 - 11,7 \text{ g.L}^{-1}$ de bioetanol sem que se tenha observado consumo total de açúcares. Este resultado, muito aquém do esperado, resultou provavelmente da demora no processamento, durante o qual as células *em stress* de nutrientes terão usado a sua reserva de açúcares para manter a viabilidade, da presença de produtos tóxicos no hidrolisado e da incapacidade das leveduras utilizadas para fermentar alguns dos açúcares presentes.

Com os resultados obtidos, a produção de etanol a partir da microalga *Scenedesmus obliquus* parece talvez um processo pouco eficiente já que, de uma lagoa com $4,5 \text{ m}^3$, que levou cerca de 2 meses a crescer, se conseguiria produzir, em condições optimizadas de extracção e fermentação, 720 g de etanol (912 mL), perspectivando uma produtividade de 288 L.ha^{-1} .

Contudo, as vantagens principais da utilização de microalgas residem na rapidez do seu crescimento face a outras culturas vegetais e na possibilidade de utilização de áreas de terreno sem qualquer outra utilidade, que, aliadas ao desenvolvimento de fotobiorreactores mais eficientes e baratos, de sistemas adequados para o processamento dos grandes volumes de biomassa microalgal e à identificação de espécies mais produtivas, poderão tornar realmente as microalgas numa matéria-prima importante para a indústria de produção de biocombustíveis. Este trabalho foi só uma primeira abordagem.

Neste trabalho identificou-se a escassez de nitrato como factor do qual depende a acumulação de açúcares nesta espécie de microalga. Há ainda que estudar outras espécies de microalgas com maior capacidade de acumulação de açúcares e o efeito da escassez dos outros nutrientes na acumulação de açúcares e sobrevivência celular.

O processamento da biomassa para extracção de açúcares deverá ser optimizado, o que poderá passar pela combinação de outros métodos físicos com o método de hidrólise ácida em autoclave de modo a reduzir a quantidade de químico a usar. Outro tipo de abordagens poderão ser estudadas para destruição das paredes celulares, como a aplicação de solventes orgânicos e a degradação enzimática.

É necessário procurar um método que permita monitorizar diária e facilmente as células de microalga em relação ao teor em açúcares. O desenvolvimento e aplicação do método de

citometria de fluxo, por exemplo, poderá permitir identificar o teor em açúcares sem ser necessário proceder, à centrifugação, secagem e posterior hidrólise ácida das células.

Por fim, a diversidade de açúcares produzidos pelas microalgas cria a necessidade de encontrar leveduras ou bactérias que sejam versáteis no tipo de substrato utilizado para realização da fermentação alcoólica.

5 BIBLIOGRAFIA

- Agbogbo, F. K., G. Coward-Kelly, M. Torry-Smith e K. S. Wenger. (2006). Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. *Process Biochemistry*, **41(11)**: 2333-2336. doi:10.1016/j.procbio.2006.05.004.
- Almeida, P. de e P. D. Silva. (2009). The peak of oil production - Timings and market recognition. *Energy Policy*, **37(4)**: 1267-1276. doi:10.1016/j.enpol.2008.11.016.
- Alvira, P., M. Ballesteros e M. J. Negro. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, **101(13)**: 4851-4861. doi:10.1016/j.biortech.2009.11.093.
- Babel, S., S. Takizawa e H. Ozaki. (2002). Factors affecting seasonal variation of membrane filtration resistance caused by *Chlorella* algae. *Water Research*, **36(5)**: 1193-202. doi:10.1016/S0043-1354(01)00333-5
- Balata, M., H. Balata e C. Oz. (2008). Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, **34(5)**: 551-573. doi:10.1016/j.pecs.2007.11.001.
- Benko, Z., A. Andersson, Z. Szengyel, M. Gáspár, K. Réczey e H. Ståhlbrand. (2007). Heat extraction of corn fiber hemicellulose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **137-140(1-12)**: 253-65. doi:10.1007/s12010-007-9056-0.
- Bhatnagar, A., S. Chinnasamy, M. Singh e K.C. Das. (2011). Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Applied Energy*, **In Press**. doi:10.1016/j.apenergy.2010.12.064.
- Boerjan, W., J. Ralph e M. Baucher. (2003). Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, **54** 519-46. doi:10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938.
- Borowitzka, M. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, **70(1-3)**: 313-321. doi:10.1016/S0168-1656(99)00083-8.
- Bouterfas, R., M. Belkoura, P. M. Abdellah, B. P. S., D. Narbonne e T. Cedex. (2006). The effects of irradiance and photoperiod on the growth rate of three freshwater green algae isolated from a eutrophic lake. *Limnetica*, **25(3)**: 647-656.
- Brennan, L. e P. Owende. (2010). Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14(2)**: 557-577. doi:10.1016/j.rser.2009.10.009.
- Buranov, A. U. e G. Mazza. (2010). Extraction and characterization of hemicelluloses from flax shives by different methods. *Carbohydrate Polymers*, **79(1)**: 17-25. doi:10.1016/j.carbpol.2009.06.014.
- Burczyk, J. e J. Dworzanski. (1988). Comparison of sporopollenin-like algal resistant polymer from cell wall of *Botryococcus*, *Scenedesmus* and *Lycopodium clavatum* by GC-pyrolysis. *Phytochemistry*, **27(7)**: 2151-2153. doi:10.1016/0031-9422(88)80115-8.

- Cara, C., E. Ruiz, M. Ballesteros, P. Manzanares, M. Negro e E. Castro. (2008). Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning. *Fuel*, **87**(6): 692-700. doi:10.1016/j.fuel.2007.05.008.
- Celekli, A., M. Balci e H. Bozkurt. (2008). Modelling of *Scenedesmus obliquus*; function of nutrients with modified Gompertz model. *Bioresource Technology*, **99**(18): 8742-7. doi:10.1016/j.biortech.2008.04.028.
- Chen, R-H, L.-B. Chiang, C.-N. Chen e T.-H. Lin. (2011). Cold-start emissions of an SI engine using ethanol–gasoline blended fuel. *Applied Thermal Engineering*, *In press* doi:10.1016/j.applthermaleng.2011.01.021.
- Cheng-Wu, Z, A. Richmond, O. Zmora e R. Kopel. (2001). An industrial-size flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis sp.* (Eustigmatophyceae). *Aquaculture*, **195**(1-2): 35-49. doi:10.1016/S0044-8486(00)00533-0.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, **25**(3): 294-306. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.02.001.
- Chisti, Y. (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, **26**(3): 126-31. doi:10.1016/j.tibtech.2007.12.002.
- Choi, S. P., M. T. Nguyen e S. J. Sim. (2010). Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. *Bioresource Technology*, **101**(14): 5330-6. doi:10.1016/j.biortech.2010.02.026.
- Choudary, P. V. e G. R. Ramananda. (1984). Molecular analysis of inorganic nitrogen assimilation in yeasts. *Archives of Microbiology*, **138**(3): 183-186. doi:10.1007/BF00402116.
- Claassen, P. A. M., J. B. van Lier, A. M. L. Contreras, E. W. J. van Niel, L. Sijtsma, A. J. M. Stams, S. S. de Vries e R. A. Weusthuis. (1999). Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **52**(6): 741-755. doi:10.1007/s002530051586.
- Converti, A., A. A. Casazza, E. Y. Ortiz, P. Perego e M. D. Borghi. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, **48**(6): 1146-1151. doi:10.1016/j.cep.2009.03.006.
- Decker, S. R., R. Brunecky, M. P. Tucker, M. E. Himmel e M. J. Selig. (2009). High-throughput screening techniques for biomass conversion. *Bioenergy Research*, **2**(4): 179-192. doi:10.1007/s12155-009-9051-0.
- Delgenes, J. P., R. Moletta e J. M. Navarro. (1996). Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, e *Candida shehatae*. *Enzyme and Microbial Technology*, **19**(3): 220-225. doi:10.1016/0141-0229(95)00237-5.
- Directive 2003/30/EC of the European Parliament and of the council on the promotion of the use of biofuels or other renewable fuels for transport, 8.5.2003,

- Directive 2003/96/EC of the European Parliament and of the council on restructuring the Community framework for the taxation of energy products and electricity, 27.10.2003
- Douskova I., J. Doucha, J. Machat, P. Novak, D. Umysova, M. Vitova e V. Zachleder (2008) Microalgae as a means for converting flue gas CO₂ into biomass with high content of starch. *Proceedings of the International Conference: Bioenergy: Challenges and Opportunities*, 6-9 Abril 2008, Guimarães, Portugal.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers e F. Smith. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, **28(3)**: 350-356. doi:10.1021/ac60111a017.9
- EIA, Energy Information Administration, (2009). *World Outlook Report 2009*.
- EIA, Energy Information Administration (2010) *International Energy Statistics*. <http://tonto.eia.doe.gov/cfapps/ipdbproject/iedindex3.cfm?tid=79&pid=80&aid=1&cid=&syid=1990&eyid=2008&unit=TBPD>, Consultado a 2011/03/17
- Elmaleh, S., H. Yahim e J. Coma. (1998). Are flocculants required in a flocculant process? *Environmental Engineering and Policy*, **1(2)**: 97-102. doi:10.1007/s100220050010.
- Eurostat (2009). *Panorama of Transport*. doi: 10.2785/28475.
- Girisuta, B., L. P. B. M. Janssen e H. J. Heeres. (2006). A kinetic study on the decomposition of 5-hydroxymethylfurfural into levulinic acid. *Green Chemistry*, **8(8)**: 701. doi:10.1039/b518176c.
- Godos, I. de, V. A. Vargas, S. Blanco, M. C. G. González, R. Soto, P. A. García-Encina, E. Becares e R. Muñoz. (2010a). A comparative evaluation of microalgae for the degradation of piggery wastewater under photosynthetic oxygenation. *Bioresource Technology*, **101(14)**: 5150-8. doi:10.1016/j.biortech.2010.02.010.
- Godos, I. de, H. O. Guzman, R. Soto, P. A. García-Encina, E. Becares, R. Muñoz e V. A. Vargas. (2010b). Coagulation/flocculation-based removal of algal-bacterial biomass from piggery wastewater treatment. *Bioresource Technology*, **102(2)**: 923-927. doi:10.1016/j.biortech.2010.09.036.
- Grima M. E., F. G. A. Fernández, F. G. Camacho e Y. Chisti. (1999). Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *Journal of Biotechnology*, **70(1-3)**: 231-247. doi:10.1016/S0168-1656(99)00078-4.
- Guo, G.-L., W.-H. Chen, L.-C. Men e W.-S. Hwang. (2008). Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production. *Bioresource Technology*, **99(14)**: 6046-53. doi:10.1016/j.biortech.2007.12.047.
- Hakkou, M., M. Petrisans, P. Gerardin e A. Zoulalian. (2006). Investigations of the reasons for fungal durability of heat-treated beech wood. *Polymer Degradation and Stability*, **91(2)**: 393-397. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2005.04.042.
- Harun, R. e M. K. Danquah. (2011a). Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. *Process Biochemistry*, **46(1)**: 304-309. doi:10.1016/j.procbio.2010.08.027.

- Harun, R. e M. K. Danquah. (2011b). Enzymatic Hydrolysis of Microalgal Biomass for Bioethanol Production. *Chemical Engineering Journal*, **In Press** doi:10.1016/j.cej.2011.01.088.
- Harun, R., M. K. Danquah e G. M. Forde. (2009). Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **85(2)**: 199-203. doi:10.1002/jctb.2287.
- Harun, R., M. Singh, G. M. Forde e M. K. Danquah. (2010a). Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14(3)**: 1037-1047. doi:10.1016/j.rser.2009.11.004.
- Harun, R., W.S.Y. Jason, T. Cherrington e M. K. Danquah. (2010b). Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production. *Applied Energy*, **In Press**. doi:10.1016/j.apenergy.2010.10.048.
- Hase, R., H. Oikawa, C. Sasao, M. Morita e Y. Watanabe. (2000). Photosynthetic production of microalgal biomass in a raceway system under greenhouse conditions in Sendai city. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **89(2)**: 157-63.
- Hendriks, A. T. W. M e G. Zeeman. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, **100(1)**: 10-8. doi:10.1016/j.biortech.2008.05.027.
- Hirano, A., R. Ueda, S. Hirayama e Y. Ogushi. (1997). CO₂ fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation. *Energy*, **22(2-3)**: 137-142. doi:10.1016/S0360-5442(96)00123-5.
- Hodaifa, G., M. E. Martínez e S. Sánchez. (2010). Influence of temperature on growth of *Scenedesmus obliquus* in diluted olive mill wastewater as culture medium. *Engineering in Life Sciences*, **10(3)**: 257-264. doi:10.1002/elsc.201000005.
- Hodaifa, G., M. E. Martínez e S. Sánchez. (2009). Daily doses of light in relation to the growth of *Scenedesmus obliquus* in diluted three-phase olive mill wastewater. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **84(10)**: 1550-1558. doi:10.1002/jctb.2219.
- Hoebler, C., J. L. Barry, A. David e J. Delort-Laval. (1989). Rapid acid hydrolysis of plant cell wall polysaccharides and simplified quantitative determination of their neutral monosaccharides by gas-liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **37(2)**: 360-367. doi:10.1021/jf00086a020.
- Hon-Nami, K. (2006). A unique feature of hydrogen recovery in endogenous starch-to-alcohol fermentation of the marine microalga, *Chlamydomonas perigranulata*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **131(1-3)**: 808-28. doi:10.1385/ABAB:131:1:808.
- Hon-Nami, K. e S. Kunito. (1998). Microalgae cultivation in a tubular bioreactor and utilization of their cells. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, **16(S1)**: 75-83. doi:10.1007/BF02849084.
- Hongzhang, C. e L. Liying. (2007). Unpolluted fractionation of wheat straw by steam explosion and ethanol extraction. *Bioresource Technology* **98(3)**: 666-76. doi:10.1016/j.biortech.2006.02.029.

- Hubbell, C. A. e A. J. Ragauskas. (2010). Effect of acid-chlorite delignification on cellulose degree of polymerization. *Bioresource Technology*, **101(19)**: 7410-5. doi:10.1016/j.biortech.2010.04.029.
- Janaun, J. e N. Ellis. (2010). Perspectives on biodiesel as a sustainable fuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14(4)**: 1312-1320. doi:10.1016/j.rser.2009.12.011.
- Jiménez, C, B. R. Cossío e F. X. Niella. (2003). Relationship between physicochemical variables and productivity in open ponds for the production of *Spirulina*: a predictive model of algal yield. *Aquaculture* **221(1-4)**: 331-345. doi:10.1016/S0044-8486(03)00123-6.
- Jorquera, O., A. Kiperstok, E. A. Sales, M. Embiruçu e M. L. Ghirardi. (2010). Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresource Technology*, **101(4)**: 1406-13. doi:10.1016/j.biortech.2009.09.038.
- KaiXian, Q. e M. A. Borowitzka. (1993). Light and nitrogen deficiency effects on the growth and composition of *Phaeodactylum tricornutum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **38(1-2)**: 93-103. doi:10.1007/BF02916415.
- Ketheesan, B. e N. Nirmalakhandan. (2011). Development of a new airlift-driven raceway reactor for algal cultivation. *Applied Energy*, *In Press* doi:10.1016/j.apenergy.2010.12.034.
- Kim, J, B. P. Lingaraju, R. Rheame, J.-Y. Lee e K. F. Siddiqui. (2010). Removal of Ammonia from Wastewater Effluent by *Chlorella vulgaris*. *Tsinghua Science & Technology*, **15(4)**: 391-396. doi:10.1016/S1007-0214(10)70078-X.
- Kim, K. M., J. W. Park, C. S. Park, S. J. Kim, K. H. Jeune, M. U. Chang e J. Acreman. (2007). Enhanced production of *Scenedesmus spp.* (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater. *Bioresource Technology*, **98(11)**: 2220-8. doi:10.1016/j.biortech.2006.08.031.
- Kong, Q.-X, L. Li, B. Martinez, P. Chen e R. Ruan. (2010). Culture of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in wastewater for biomass feedstock production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **160(1)**: 9-18. doi:10.1007/s12010-009-8670-4.
- Kontturi, E. e T. Vuorinen. (2008). Indirect evidence of supramolecular changes within cellulose microfibrils of chemical pulp fibers upon drying. *Cellulose*, **16(1)**: 65-74. doi:10.1007/s10570-008-9235-3.
- Krauss, R. W. e W. H. Thomas. (1954). The Growth and Inorganic Nutrition of *Scenedesmus obliquus* in Mass Culture. *Plant Physiology*, **29(3)**: 205-14.
- Larsson, S., E. Palmqvist, B. Hahn-Hägerdal, C. Tenborg, K. Stenberg, G. Zacchi e N.-O. Nilvebrant. (1999). The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbial Technology*, **24(3-4)**: 151-159. doi:10.1016/S0141-0229(98)00101-X.
- Lavoie, A. e J. de La Noüe. (1985). Hyperconcentrated cultures of *Scenedesmus obliquus*: A new approach for wastewater biological tertiary treatment? *Water Research*, **19(11)**: 1437-1442. doi:10.1016/0043-1354(85)90311-2.

- Ledigabel, F. e L. Averous. (2006). Effects of lignin content on the properties of lignocellulose-based biocomposites. *Carbohydrate Polymers*, **66(4)**: 537-545. doi:10.1016/j.carbpol.2006.04.023.
- Lee, A. K., D. M. Lewis e P. J. Ashman. (2010a). Energy requirements and economic analysis of a full-scale microbial flocculation system for microalgal harvesting. *Chemical Engineering Research and Design*, **88(8)**: 988-996. doi:10.1016/j.cherd.2010.01.036.
- Lee, J.-Y., C. Yoo, S.-Y. Jun, C.-Y. Ahn, e H.-M. Oh. (2010b). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, **101(Suppl. 1)**: S75-S77. doi:10.1016/j.biortech.2009.03.058.
- Li, A., B. Antizar-Ladislao e M. Khraisheh. (2007). Bioconversion of municipal solid waste to glucose for bio-ethanol production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **30(3)**: 189-96. doi:10.1007/s00449-007-0114-3.
- Lynd, L. R., P. J. Weimer, W. H. Van Zyl e I. S. Pretorius. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **66(3)**: 506. doi:10.1128/MMBR.66.3.506.
- Macedo, I., J. Seabra e J. Silva. (2008). Green house gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. *Biomass and Bioenergy*, **32(7)**: 582-595. doi:10.1016/j.biombioe.2007.12.006
- Maggio, G. e G. Cacciola. (2009). A variant of the Hubbert curve for world oil production forecasts. *Energy Policy*, **37(11)**: 4761-4770. doi:10.1016/j.enpol.2009.06.053.
- Martínez, M., J. M. Jiménez e F. El Yousfi. (1999). Influence of phosphorus concentration and temperature on growth and phosphorus uptake by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, **67(3)**: 233-240. doi:10.1016/S0960-8524(98)00120-5.
- Martínez, M. E., S. Sánchez, J. M. Jiménez, F. E. Yousfi e L. Muñoz. (2000). Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, **73(3)**: 263-272. doi:10.1016/S0960-8524(99)00121-2.
- Mata, T. M., A. A. Martins e N. S. Caetano. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14(1)**: 217-232. doi:10.1016/j.rser.2009.07.020.
- Matsumoto, M., H. Yokouchi, N. Suzuki, H. Ohata e T. Matsunaga. (2003). Saccharification of Marine Microalgae Using Marine Bacteria for Ethanol Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **105(1-3)**: 247-254. doi:10.1385/ABAB:105:1-3:247.
- Millati, R., C. Niklasson e M. J. Taherzadeh. (2002). Effect of pH, time and temperature of overliming on detoxification of dilute-acid hydrolyzates for fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*, **38(4)**: 515-522. doi:10.1016/S0032-9592(02)00176-0.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, **31(3)**: 426-428. doi:10.1021/ac60147a030.
- Mohagheghi, A., M. Ruth e D. Schell. (2006). Conditioning hemicellulose hydrolysates for fermentation: Effects of overliming pH on sugar and ethanol yields. *Process Biochemistry*, **41(8)**: 1806-1811. doi:10.1016/j.procbio.2006.03.028.

- Mussatto, S. I., G. Dragone, P. M. R. Guimarães, J. P. A. Silva, L. M. Carneiro, I. C. Roberto, A. Vicente, L. Domingues e J. A. Teixeira. (2010). Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production-R1. *Biotechnology Advances*, **28(6)**: 817-830. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.07.001.
- Mussnug, J. H., V. Klassen, A. Schlüter e O. Kruse. (2010). Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of Biotechnology*, **150(1)**: 51-56. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.07.030.
- Narendranath, N. V., K. C. Thomas e W. M. Ingledew. (2001). Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology*, **26(3)**: 171-7. doi:10.1038/sj/jim/7000090.
- Negro, M., P. Manzanares, J. M. Oliva, I. Ballesteros e M. Ballesteros. (2003). Changes in various physical/chemical parameters of *Pinus pinaster* wood after steam explosion pretreatment. *Biomass and Bioenergy*, **25(3)**: 301-308. doi:10.1016/S0961-9534(03)00017-5.
- Neureiter, M., H. Danner, C. Thomasser, B. Saidi e R. Braun. (2002). Dilute-Acid Hydrolysis of Sugarcane Bagasse at Varying Conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **98-100(1)**: 49-58. doi:10.1385/ABAB:98-100:1-9:49.
- Ngang, J. J. E., F. Letourneau e P. Villa. (2006). Alcoholic fermentation of beet molasses: effects of lactic acid on yeast fermentation parameters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **73(2)**: 291-6. doi:10.1007/s00253-006-0599-8.
- Nguyen, M. T., S. P. Choi, J. Lee, J. H. Lee e S. J. Sim. (2009). Hydrothermal Acid Pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* Biomass for Ethanol Production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **19(2)**: 161-166. doi:10.4014/jmb.0810.578.
- Nigam, P. S. e A. Singh. (2010). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, **37(1)**: 52-68. doi:10.1016/j.pecs.2010.01.003.
- Ogbonna, J. C., H. Mashima e H. Tanaka. (2001). Scale up of fuel ethanol production from sugar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor. *Bioresource Technology*, **76(1)**: 1-8. doi:10.1016/S0960-8524(00)00084-5
- Oijen, T. V., M. J. W. Veldhuis, M. Y. Gorbunov, J. Nishioka, M. A. Van Leeuwe e H. J. W. De Baar. (2005). Enhanced carbohydrate production by Southern Ocean phytoplankton in response to in situ iron fertilization. *Marine Chemistry*, **93(1)**: 33-52. doi:10.1016/j.marchem.2004.06.039.
- Olsson, L. e B. Hahn-Hägerdal. (1996). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*, **18(5)**: 312-331. doi:10.1016/0141-0229(95)00157-3.
- Palmqvist, E. e B. Hahn-Hägerdal. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, **74(1)**: 25-33. doi:10.1016/S0960-8524(99)00161-3.
- Park, I., I. Kim, K. Kang, H. Sohn, I. Rhee, I. Jin e H. Jang. (2010). Cellulose ethanol production from waste newsprint by simultaneous saccharification and fermentation using

- Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. *Process Biochemistry*, **45(4)**: 487-492. doi:10.1016/j.procbio.2009.11.006.
- Perez-Garcia, O., F. M.E. Escalante, L. E. De-Bashan e Y. Bashan. (2010). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, **45(1)**: 11-36. doi:10.1016/j.watres.2010.08.037
- Perimenis, A., H. Walimwipi, S. Zinoviev, F. Müller-Langer e S. Miertus. (2011). Development of a decision support tool for the assessment of biofuels. *Energy Policy*, **39(3)**: 1782-1793. doi:10.1016/j.enpol.2011.01.011.
- Pleanjai, S. e S. H. Gheewala. (2009). Full chain energy analysis of biodiesel production from palm oil in Thailand. *Applied Energy*, **86**: S209-S214. doi:10.1016/j.apenergy.2009.05.013.
- Raposo, M. F. J., J. Bowen, A. J. Young e R. Morais. (2001). Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus pluvialis*: effects on astaxanthin recovery and implications for bio-availability. *Journal of Applied Phycology*, **13(1)**: 19-24. doi:10.1023/A:1008183429747.
- Razmovski, R. e V. Vučurović. (2011). Ethanol production from sugar beet molasses by *S. cerevisiae* entrapped in an alginate–maize stem ground tissue matrix. *Enzyme and Microbial Technology*, *In Press*. doi:10.1016/j.enzmictec.2010.12.015.
- Reijnders, L. (2009). Microalgal and Terrestrial Transport Biofuels to Displace Fossil Fuels. *Energies*, **2(1)**: 48-56. doi:10.3390/en20100048.
- Renault, F., B. Sancey, P.-M. Badot e G. Crini. (2009). Chitosan for coagulation/flocculation processes – An eco-friendly approach. *European Polymer Journal*, **45(5)**: 1337-1348. doi:10.1016/j.eurpolymj.2008.12.027.
- Rezanka, T., V. Přikrylová, S. V. Yarotsky e M. Podojil. (1983). Monosaccharides of the green fresh-water alga *Chlorella kessleri*. *Folia Microbiologica*, **28(4)**: 287-291. doi:10.1007/BF02879560.
- Rossignol, N., L. Vandanjon, P. Jaouen e F. Quéméneur. (1999). Membrane technology for the continuous separation microalgae/culture medium: compared performances of cross-flow microfiltration and ultrafiltration. *Aquacultural Engineering*, **20(3)**: 191-208. doi:10.1016/S0144-8609(99)00018-7.
- Sánchez, O. J. e C. A. Cardona. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, **99(13)**: 5270-95. doi:10.1016/j.biortech.2007.11.013.
- Savard, T., C. Beaulieu, N.J. Gardner e C.P. Champagne. (2002). Characterization of spoilage yeasts isolated from fermented vegetables and inhibition by lactic, acetic and propionic acids. *Food Microbiology*, **19(4)**: 363–373. doi:10.1006/yfmic.483.
- Schenk, P. M., S. R. Thomas-Hall, E. Stephens, U. C. Marx, J. H. Mussgnug, C. Posten, O. Kruse e B. Hankamer. (2008). Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *Bioenergy Research*, **1(1)**: 20-43. doi:10.1007/s12155-008-9008-8.

- Shelef, G. e Soeder, C. J. (1978). *Algae Biomass*. Elsevier.
- Shiraiwa, Y., A. Goyal e N. E. Tolbert. (1993). Alkalization of the Medium by Unicellular Green Algae during Uptake of Dissolved Inorganic Carbon. *Plant Cell Physiology*, **34(5)**: 649-657.
- Slininger, P. J., R. J. Bothast, M. R. Okos, e M. R. Ladisch. (1985). Comparative evaluation of ethanol production by xylose-fermenting yeasts presented high xylose concentrations. *Biotechnology Letters*, **7(6)**: 4-8. doi:10.1007/BF01166218.
- Socol, C. R., L. P. De S. Vandenberghe, A. B. P. Medeiros, S. Grace Karp, M. Buckeridge, L. P. Ramos, A. P. Pitarelo, V. Ferreira-Leitão, L. M. F. Gottschalk, M. A. Ferrara, Elba Pinto da Silva Bon, L. M. P. de Moraes, J. de A. Araújo e F. A. G. Torres. (2010). Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresource Technology*, **101(13)**: 4820-5. doi:10.1016/j.biortech.2009.11.067.
- Soeder, C. J. e Hegewald, E. Scenedesmus. In: Borowitzka, M. A. e Borowitzka, L. J., Editors, *Micro-algal Biotechnology*, Cambridge University Press, Cambridge (1992), pp. 59–88.
- Sorda, G., M. Banse, e C. Kemfert. (2010). An overview of biofuel policies across the world. *Energy Policy*, **38(11)**: 6977-6988. doi:10.1016/j.enpol.2010.06.066.
- Spolaore, P., C. Joannis-Cassan, E. Duran, e A. Isambert. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **101(2)**: 87-96. doi:10.1263/jbb.101.87.
- Sun, W.-L. e W.-Y. Tao. (2010). Comparison of cell growth and ethanol productivity on different pretreatment of rice straw hemicellulose hydrolysate by using *Candida shehatae* CICC 1766. *African Journal of Microbiology Research*, **4(11)**: 1105-1109.
- Sørensen, A., P. J. Teller, T. Hilstrøm, e B. K. Ahring. (2008). Hydrolysis of Miscanthus for bioethanol production using dilute acid presoaking combined with wet explosion pretreatment and enzymatic treatment. *Bioresource Technology*, **99(14)**: 6602-7. doi:10.1016/j.biortech.2007.09.091.
- Takeda, H. (1993). Taxonomical assignment of chlorococcal algae from their cell wall composition. *Phytochemistry*, **34(4)**: 1053-1055. doi:10.1016/S0031-9422(00)90712-X.
- Takeda, H. (1996). Cell wall sugars of some Scenedesmus species. *Phytochemistry*, **42(3)**: 673-675. doi:10.1016/0031-9422(95)00952-3.
- Tasic, M., B. Konstantinovic, M. Lazic e V. Veljkovic. (2009). The acid hydrolysis of potato tuber mash in bioethanol production. *Biochemical Engineering Journal*, **43(2)**: 208-211. doi:10.1016/j.bej.2008.09.019.
- Tester, R., X. Qi e J. Karkalas. (2006). Hydrolysis of native starches with amylases. *Animal Feed Science and Technology*, **130(1-2)**: 39-54. doi:10.1016/j.anifeeds.2006.01.016.
- Thomas, K. C., S. H. Hynes e W. M. Ingledew. (2002). Influence of Medium Buffering Capacity on Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* Growth by Acetic and Lactic Acids. *Applied and Environmental Microbiology*, **68(4)**: 1616-1623. doi:10.1128/AEM.68.4.1616.

- Toro, M. E., F. Vazquez, S. C. Gouiric, M. D. Vallejo e L. A. Rodri. (2010). Bioethanol production from grape and sugar beet pomaces by solid-state fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, **35(11)**: 5914-5917. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.12.112.
- Ueno, Y., N. Kurano e S. Miyachi. (1998). Ethanol Production by Dark Fermentation in the Marine Green Alga *Chlorococcum littorale*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **86(1)**: 38-43
- Urrutia, I., J. L. Serra e M. J. Llama. (1995). Nitrate removal from water by *Scenedesmus obliquus* immobilized in polymeric foams. *Enzyme and Microbial Technology*, **17(3)**: 200-205. doi:10.1016/0141-0229(94)00008-F.
- Walfridsson, M., X. Bao, M. Anderlund, G. Lilius, L. Bülow e B. Hahn-Hägerdal. (1996). Ethanol fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus* xylA gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase. *Applied and Environmental Microbiology*, **62(12)**: 4648-51.
- Warr, S. R. C., R. H. Reed e W. D. P. Stewart. (1985) Carbohydrate Accumulation in Osmotically Stressed Cyanobacteria (Blue-Green Algae): Interactions of Temperature and Salinity. *New Phytologist*, **100(3)**: 285-292
- Wen, Z.-Y. e F. Chen. (2003). Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances*, **21(4)**: 273-294. doi:10.1016/S0734-9750(03)00051-X.
- Wu, X., S. Staggenborg, J. L. Propheter, W. L. Rooney, J. Yu e D. Wang. (2010). Features of sweet sorghum juice and their performance in ethanol fermentation. *Industrial Crops and Products*, **31(1)**: 164-170. doi:10.1016/j.indcrop.2009.10.006.
- Xavier, A. M. R. B., M. F. Correia, S. R. Pereira e D. V. Evtuguin. (2010). Second-generation bioethanol from eucalypt sulphite spent liquor. *Bioresource Technology*, **101(8)**: 2755-61. doi:10.1016/j.biortech.2009.11.092.
- Yoon, S, R. Mukerjee e J. F. Robyt. (2003). Specificity of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in removing carbohydrates by fermentation. *Carbohydrate Research*, **338(10)**: 1127-1132. doi:10.1016/S0008-6215(03)00097-1.
- Zeiler, K. G., D. A. Heacox, S. T. Toon, K. L. Kadam e L. M. Brown. (1995). The use of microalgae for assimilation and utilization of carbon dioxide from fossil fuel-fired power plant flue gas. *Energy Conversion and Management*, **36(6-9)**: 707-712. doi:10.1016/0196-8904(95)00103-K.
- Zhang, X., Q. Hu, M. Sommerfeld, E. Puruhito, e Y. Chen. (2010). Harvesting algal biomass for biofuels using ultrafiltration membranes. *Bioresource Technology*, **101(14)**: 5297-5304. doi:10.1016/j.biortech.2010.02.007.
- Zhila, N. O., G. S. Kalacheva e T. G. Volova. (2005). Influence of nitrogen deficiency on biochemical composition of the green alga *Botryococcus*. *Journal of Applied Phycology*, **17(4)**: 309-315. doi:10.1007/s10811-005-7212-x.
- Zimbardi, F., E. Viola, F. Nanna, E. Larocca, M. Cardinale e D. Barisano. (2007). Acid impregnation and steam explosion of corn stover in batch processes. *Industrial Crops and Products*, **26(2)**: 195-206. doi:10.1016/j.indcrop.2007.03.005.

ANEXO I – REAGENTES QUÍMICOS

Os reagentes químicos utilizados ao longo do trabalho experimental encontram-se discriminados no Quadro I.1.

Quadro I.1 – Lista dos reagentes químicos utilizados ao longo do trabalho experimental

Nome	PM	Fórmula	Pureza	Outras-- Características	Marca	Utilização
Ácido 3,5-dinitrossalicílico	228,12	$C_7H_6O_5 \cdot H_2O$	puro	--	Merck	AR
Ácido acético glacial	60,05	$C_2H_4O_2$	HPLC grade	> 99,8 %	Scharlau	HPLC
Ácido bórico	61,83	H_3BO_3	p.a.	> 99 %	Riedel-de-Haën	CA
Ácido butírico	88,11	$C_4H_8O_2$	Puríssimo	99,5 %	Fluka	HPLC
Ácido clorídrico	36,46	HCl	p.a.	37%;--d=1,19	Merck	RC
Ácido fórmico	46,03	CH_2O_2	p. a.	98 %	MERCK	HPLC
Ácido láctico	90,08	$C_3H_6O_3$	p.a.	98 %	Sigma	HPLC
Ácido nítrico	63,01	HNO_3	p.a.	65%;--d=1,40	Riedel-de-Haën	DH
Ácido orto-fosfórico	98,00	H_3PO_4	p.a.	85%;--d=1,71	Merck	DH
Ácido propiónico	74,08	$C_3H_6O_2$	p.a.	99 %	Sigma	HPLC
Ácido sulfúrico	98,08	H_2SO_4	p.a.	95-97%;--d=1,84	Sigma	AT;RC
Agar	--	--	--	--	Merck	CL
Amido	--	$(C_6H_{10}O_5)_n$	p.a.	--	Merck	CL
Arabinose	150,13	$C_5H_{10}O_5$	p.a.	99 %	MERCK	HPLC
Bacto-peptona	--	--	--	--	Cultimed	CL
Bicarbonato de sódio	84,01	$NaHCO_3$	p.a.	99,5%	Fluka	CI
Carbonato de sódio	105,99	Na_2CO_3	p.a.	99,5%	Fluka	CI
Cloreto de cálcio dihidratado	147,01	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	p.a.	99,5 %	Riedel-de-Haën	CA
Cloreto de cobalto	129,84	$CoCl_2$	--	--		CA
Cloreto de sódio	58,44	NaCl	p.a.	99,5%	Fisher-Scientific Fluka	CA;CL CI
Dihidrogenofosfato de potássio	136,09	KH_2PO_4	p.a.	99 %	Riedel-de-Haën	CA
Etanol	46,07	C_2H_6O	p.a.	99,5%	Panreac	DE
Extracto de levedura	--	--	--	--	Biokar--Diagnostics	CL

Continuação do Quadro I.1.

Nome	PM	Fórmula	Pureza	Outras-- Características	Marca	Utilização
Extracto de malte	--	--	--	--	Difco	CL
Fe-EDTA	367,05	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ NaFeO ₈	purum	--	Fluka	CA
Fenol	94,11	C ₆ H ₆ O	p.a.	--	Merck	AT
Fosfato de potássio monobásico	174,18	K ₂ HPO ₄	p.a.	99 %	Sigma	CI
Furfural	96,08	C ₅ H ₄ O ₂	HPLC grade	99 %	Sigma	HPLC
D-Glucose anidra	180,16	C ₆ H ₁₂ O ₆	p.a.	99,5%	Pronalab	CL, HPLC
Hidróxido de cálcio	74,09	Ca(OH) ₂	p.a.	96%	Riedel-de-Haën	DH
Hidróxido de sódio	40,04	NaOH	p.a.	puro	JMS	AR
5-Hidroxiacetilfurfural	126,1	C ₆ H ₆ O ₃	HPLC grade	99%	Sigma	HPLC
Molibdato de sódio dihidratado	241,95	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	p.a.	99,5 %	Merck	CA
Nitrato de sódio	84,99	NaNO ₃	p.a. p.a..	-- 99,99%	Merck Fluka	CA CI
Nitrito de sódio	69,00	NaNO ₂	p.a.	99 %	Fluka	CI
2-Propanol	60,1	C ₃ H ₈ O	p.a.	99%	MERCK	DE
Sulfato de amónio	132,14	(NH ₄) ₂ SO ₄	p.a.	99 %	Riedel-de-Haën	CL
Sulfato de cobre	159,60	CuSO ₄	p.a.	99 %	Merck	CA
Sulfato de magnésio heptahidratado	246,48	MgSO ₄ .7H ₂ O	p.a.	99 %	Merck	CA;CL
Sulfato de manganês tetrahidratado	223	MnSO ₄ .4H ₂ O	p.a.	99%	Riedel-de-Haën	CA
Sulfato de sódio	142,04	Na ₂ SO ₄	p.a.	99,00%	Sigma	AR;AT; CI
Sulfato de zinco heptahidratado	233,47	ZnSO ₄ .7H ₂ O	uso geral	99 %	BDH	CA
Tartarato duplo de sódio e potássio	282,23	C ₄ H ₄ KNaO ₆ .4H ₂ O	p.a.	99 %	Panreac	AR
Tiosulfato de sódio	158,10	Na ₂ S ₂ O ₃	p.a.	99,50%	Fluka	CI
D-Xilose	150,13	C ₅ H ₁₀ O ₅	Fins bioquímicos	99%	Merck	CL, HPLC

AR – açúcares redutores

CI – cromatografia iónica

HPLC

AT – açúcares totais

CL – crescimento de leveduras

RC – ensaios de ruptura celular

CA – crescimento de algas

DE – determinação de etanol